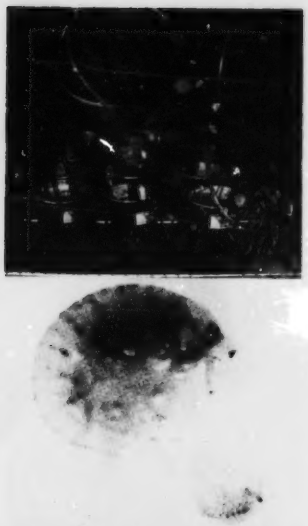
SPE 1/RM/33 - Décembre 1997
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada



SÉRIE DE LA
PROTECTION DE
L'ENVIRONNEMENT

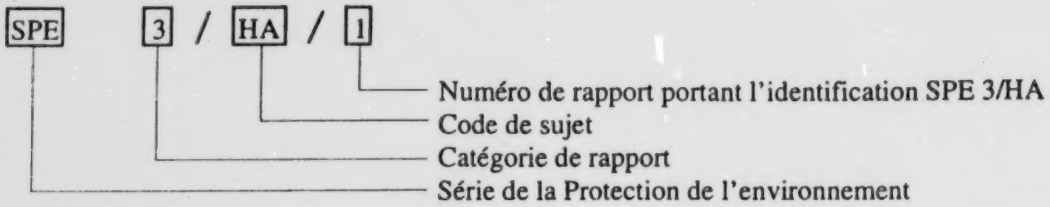
Méthode d'essai biologique: essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments

Environnement Canada Environment Canada

Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

Sujets

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Printed on recycled paper

Imprimé sur du papier recyclé

Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/33
Décembre 1997

Données de catalogage avant publication (Canada)

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique. Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments

(Rapport : SPE 1/RM/33
Publ. aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-660-95570-9
N° de cat. En49-24/1-33F

1. Hyalella -- Toxicologie -- Canada.
2. Amphipodes -- Toxicologie -- Canada.
3. Sédiments des estuaires -- Toxicologie -- Canada.
4. Environnement -- Surveillance -- Canada.
5. Toxicité -- Tests -- Méthodologie -- Canada.
I. Centre de technologie environnementale (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes.
II. Canada. Environnement Canada.
III. Coll. : Rapport d'information (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/33.

QI.444.M315B54 1998 595.37'8 C98-980048-2

© Ministre de Travaux publics et Services gouvernementaux 1997

Commentaires

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
3439, River Road South
Gloucester (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English from:

Environmental Protection Publications
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation de l'emploi de ces produits par Environnement Canada.

Résumé

Le présent rapport décrit les méthodes que recommande Environnement Canada pour déterminer la toxicité des sédiments à l'aide de l'amphipode dulcicole Hyalella azteca. *Les paramètres de mesure sont la survie et le poids des amphipodes à la fin des 14 jours du test. Si ce dernier s'applique principalement aux sédiments des milieux d'eau douce, des modes opératoires concernent cependant les sédiments estuariens (salinité ≤ 15 ‰).*

Les bechers ou les jarres de verre utilisés, de 300 mL, renferment 100 mL de sédiment recouvert de 175 mL d'eau. On les maintient à 23 ± 1 °C. Il en faut normalement cinq, au moins, logeant chacun, au début de l'essai, 10 H. azteca *de deux à neuf jours, par variante de l'expérience. Le test peut porter sur une seule concentration (p. ex. échantillons non dilués de sédiment prélevé sur le terrain) ou sur une gamme de concentrations (p. ex. sédiment enrichi de différentes concentrations d'un mélange de substances chimiques ou d'un autre sédiment) afin de déterminer le seuil d'apparition de l'effet.*

Durant le test, on peut renouveler ou non l'eau surnageante. Dans chaque récipient, le renouvellement doit se faire deux fois par jour, et, normalement, on n'aère pas l'eau. Mais on l'aère si on préfère ne pas la renouveler. Quelle que soit l'option retenue, on nourrit les sujets de l'expérience d'un mélange de levure, de Cerophyll[MC] *et de nourriture pour truite (*trout chow*) [mélange LCT]. On ajoute une suspension aqueuse de LCT dans chaque récipient, soit journellement, à raison de 1,5 mL (ce qui équivaut à environ 2,7 mg, poids sec), soit trois fois par semaine, en des journées non consécutives, à raison de 3,5 mL (environ 6,3 mg, poids sec). Le choix du régime dépend de l'objectif de l'étude et, peut-être aussi, des lignes directrices ou des exigences réglementaires.*

*Le rapport expose les conditions et le mode opératoire généraux ou universels de la préparation et de l'exécution de l'essai. S'y ajoutent des conditions et des modes opératoires propres à la finalité de l'essai. Ce dernier mesure et évalue la toxicité d'échantillons de sédiment, de boue ou de matières particulaires semblables, prélevés sur le terrain, ou de sédiment enrichi au laboratoire de substances ou de produits chimiques, de sédiment contaminé ou d'autres matières particulaires. Le rapport énonce aussi des instructions et des exigences sur les installations expérimentales, sur le prélèvement des échantillons, leur manutention et leur entreposage, l'élevage d'*H. azteca, *la préparation des mélanges ou leur enrichissement, la mise en branle des essais, les conditions expérimentales précises, les observations et les mesures convenables à faire, les paramètres de mesure, les méthodes de calcul et l'emploi de toxiques de référence.*

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing sediment toxicity tests using the freshwater amphipod Hyalella azteca *are described in this report. The endpoints for the test are survival and weight of amphipods at the end of a 14-day assay. The test is intended primarily for measuring the adverse effect(s) of freshwater sediments, although procedures for testing estuarine sediments (≤15 ‰ salinity) are also described.*

This 14-day sediment-toxicity test is conducted at 23 ± 1 °C in 300-mL glass beakers or jars containing a 100-mL layer of sediment and 175 mL of overlying water. A minimum of five test chambers, each containing 10 H. azteca, *are normally used to replicate each treatment. The test may be run as a single-concentration assay (e.g., using undiluted samples of field-collected sediment), or as a multi-concentration assay (e.g., a spiked-sediment test with chemical/sediment mixtures) to determine the threshold of effect. Amphipods are 2 to 9 days old at the start of the test.*

The test may be performed either as an intermittent-renewal assay, or as a static (i.e., no renewal) toxicity test. If the renewal option is chosen, twice daily renewal of the overlying water in each test chamber is required, and the overlying water is normally not aerated. If the static option is chosen, the overlying water is aerated. Using either test option, the animals are fed a mixture of yeast, Cerophyll™, and trout chow (YCT). An aqueous suspension of YCT is added to each test chamber, either as a daily inoculum of 1.5 mL (equivalent to ~2.7 mg dry weight), or three times per week on nonconsecutive days using an inoculum of 3.5 mL (~6.3 mg dry weight). Selection of either option depends on the objectives of the study and perhaps also on regulatory guidelines or requirements.

General or universal conditions and procedures are outlined for test preparation and performance. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific to the intended use of the test. This test is suitable for measuring and assessing the toxicity of samples of field-collected sediment, sludge, or similar particulate material, or of sediment spiked (mixed) in the laboratory with chemical(s) or chemical substance(s), contaminated sediment, or other particulate material. Instructions and requirements are included on test facilities, sample collection, handling and storing samples, culturing H. azteca, *preparing sediment or spiked-sediment mixtures and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, and the use of reference toxicants.*

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de ***méthodes recommandées*** *pour mesurer et évaluer les effets des substances ou des matières toxiques en milieu aquatique. Ces méthodes ont été évaluées par Environnement Canada et elles sont recommandées pour les applications suivantes :*

- *mesures de la toxicité en milieu aquatique dans les laboratoires d'Environnement Canada ;*
- *essais impartis par Environnement Canada ou demandés par des organismes ou des entreprises de l'extérieur ;*
- *mesures pour lesquelles on ne dispose pas d'instructions plus précises, comme dans les règlements ;*
- *comme base d'instructions très explicites, comme pourrait en exiger un protocole réglementaire ou une méthode normalisée de référence.*

On a retenu les différents types d'essais compris dans cette série parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en œuvre par Environnement Canada. Les documents de la collection visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour la collecte de données sur les effets toxiques — pour la vie aquatique — de certaines substances ou matières destinées à se retrouver dans le milieu aquatique ou s'y trouvant déjà. Selon la méthode choisie de dosage biologique, les substances ou les matières dont on veut mesurer la toxicité pourraient comprendre des échantillons de substances ou de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats, d'eaux réceptrices ou, s'il y a lieu, de sédiments ou de matières particulaires semblables.

Table des matières

Résumé v
Abstract vi
Avant-propos vii
Liste des tableaux xi
Liste des figures xi
Liste des abréviations et des formules chimiques xii
Terminologie xiv
Remerciements xxi

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 Identification, répartition, cycle biologique 5
1.3 Emploi antérieur dans les essais toxicologiques 5
1.4 Tolérance et sensibilité relative en laboratoire 7

Section 2
Organismes d'essai 10
2.1 Espèces et stade 10
2.2 Origine et acclimatation 10
2.3 Élevage 11
2.3.1 Généralités 11
2.3.2 Installations et appareillage 12
2.3.3 Éclairage 14
2.3.4 Eau d'élevage 14
2.3.5 Température 16
2.3.6 Oxygène dissous 16
2.3.7 Substrat 16
2.3.8 Alimentation 16
2.3.9 Manipulation des organismes 16
2.3.10 Élevages d'âges mélangés et d'âge connu 17
2.3.11 Critères de santé 18

Section 3
Système expérimental 20
3.1 Installations et appareillage 20
3.2 Éclairage 22
3.3 Enceintes expérimentales 22
3.4 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution 22
3.5 Sédiment témoin 22

Section 4

Modes opératoires universels 24
4.1 Début de l'essai 28
4.2 Conditions expérimentales 30
4.3 Oxygène dissous et aération 31
4.4 Nourriture et alimentation 31
4.5 Observations et mesures au cours de l'essai 32
4.6 Fin de l'essai 34
4.7 Paramètres de mesure et calculs 36
4.8 Essais avec toxique(s) de référence 36

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sédiment (ou de matières particulaires semblables) prélevé sur le terrain 41
5.1 Prélèvement de l'échantillon 41
5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse de l'échantillon 43
5.3 Préparation de l'échantillon en vue des essais 45
5.4 Eau d'essai 46
5.5 Observations et mesures au cours de l'essai 47
5.6 Paramètres de mesure et calculs 47
5.6.1 Variations dans le plan d'expérience et dans les analyses 49
5.6.2 Analyse de la puissance 51

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais employant des sédiments enrichis 53
6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon 53
6.2 Préparation des mélanges destinés aux essais 54
6.3 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution 58
6.4 Observations et mesures expérimentales 58
6.5 Paramètres de mesure et calculs 58
6.5.1 Concentration létale médiane (CL50) 59
6.5.2 Concentration inhibitrice (CIp) 62
6.5.3 Test d'hypothèse (CSEO et CEMO) 63

Section 7

Rapports ou procès-verbaux à produire 66
7.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai 67
7.1.1 Substance ou matière d'essai 67
7.1.2 Organismes utilisés 67
7.1.3 Installations expérimentales 67
7.1.4 Eau d'essai 67
7.1.5 Méthode expérimentale 67

7.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires 67
7.1.7 Résultats 68
7.2 Exigences supplémentaires 68
7.2.1 Substance ou matière d'essai 69
7.2.2 Organismes d'essai 69
7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux 69
7.2.4 Sédiment témoin et eau d'essai 69
7.2.5 Méthode expérimentale 70
7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires 70
7.2.7 Résultats de l'essai 70
Travaux cités 72

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (juillet 1997) 87

Annexe B
Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada 89

Annexe C
Variantes des méthodes d'élevage d'*Hyalella azteca*, décrites dans les documents canadiens et américains 90

Annexe D
Variantes du mode opératoire des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'*Hyalella azteca*, décrites dans les documents canadiens et américains 98

Annexe E
Variantes du mode opératoire des essais toxicologiques référence à l'aide d'*Hyalella azteca*, décrites dans les documents canadiens et américains . 109

Annexe F
Systématique générale d'*Hyalella azteca* (Saussure, 1858) 114

Annexe G
Préparation de l'aliment LCT destiné à *Hyalella azteca* 120

Annexe H
Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques 122

102-04806/

Liste des tableaux

1. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage des *Hyalella azteca* destinés aux essais de mesure de la toxicité des sédiments 13

2. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour la mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'*Hyalella azteca* 24

3. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais toxicologiques de référence dans *l'eau seulement* avec *Hyalella azteca* 38

Liste des figures

1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais toxicologiques avec *Hyalella azteca* et divers types de matières ou de substances 3

2. — Estimation de la concentration létale médiane, par établissement du graphique des taux de mortalité sur papier log-probabilité 61

Liste des abréviations et des formules chimiques

µg	microgramme
µm	micromètre
µS/cm	microsiemens par centimètre
σ	écart-type
ANOVA	analyse de la variance
$CaCO_3$	carbonate de calcium
$CaSO_4$	sulfate de calcium
$CdCl_2$	chlorure de cadmium
CEMO	concentration avec effet minimal observé
CESO	concentration avec effet de seuil observé
CIp	concentration inhibitrice d'un pourcentage (précisé) d'effet
CL50	concentration létale médiane
cm	centimètre
CSEO	concentration sans effet observé
$CuSO_4$	sulfate de cuivre
CV	coefficient de variation
ESM	écart significatif minimal
g	gramme
h	heure
j	jour
KCl	chlorure de potassium
kg	kilogramme
L	litre
LCT	levure, Cerophyll[MC] et aliment pour truite
mg	milligramme
MC	marque de commerce
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mS	millisiemens
NaCl	chlorure de sodium
$NaHCO_3$	bicarbonate de sodium
O_2	oxygène
OD	oxygène dissous
s	seconde
v/v	en volume, volume/volume
<	plus petit que
>	plus grand que
%	pour cent
≥	plus grand que ou égal à

≤	plus petit que ou égal à
±	plus ou moins
‰	partie par millier ; pour mille ; millième
°C	degré Celsius

Terminologie

Nota : toutes les définitions s'inscrivent dans le contexte du présent rapport ; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* exprime une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait (devraient)* et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*), etc. expriment une recommandation ou la nécessité de respecter dans la mesure du possible la condition ou la méthode.

L'auxiliaire *peut (peuvent)* autorise une action.

L'auxiliaire *pourrait (pourraient)* indique la possibilité ou l'éventualité.

Termes techniques généraux

à renouvellement continu, se dit d'un appareillage ou d'essais dans lesquels on renouvelle continuellement la solution ou l'eau surnageante du milieu expérimental par l'apport constant d'une solution fraîche.

à renouvellement périodique, syn de À RENOUVELLEMENT INTERMITTENT.

à renouvellement intermittent, se dit d'un essai toxicologique au cours duquel on renouvelle périodiquement la solution ou l'eau surnageante, habituellement au début de chaque période de 12 ou de 24 h. Syn. À RENOUVELLEMENT PÉRIODIQUE.

acclimatation, adaptation physiologique à une valeur précise d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple à la température. S'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

conductivité, grandeur physique caractérisant la capacité de conduction du courant électrique par une solution aqueuse. Elle dépend de la concentration des ions en solution, de leur valence, de leur mobilité et de la température de la solution. L'unité est le microhm^{-1} · centimètre^{-1} ($\mu\Omega^{-1} \cdot cm^{-1}$) ou le millisiemens/mètre ($mS \cdot m^{-1}$).

conformité, respect des exigences officielles en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

en conditions statiques, se dit d'un essai toxicologique au cours duquel on ne renouvelle pas les solutions ni l'eau surnageante.

lux, unité d'éclairement, c'est-à-dire l'intensité lumineuse par mètre carré. Le lux = 0,0929 pied-bougie ; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

pH, logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Le pH exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines sur une échelle de 0 à 14, où le pH 7 représente la neutralité. Les pH inférieurs à 7 correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes, alors que les pH supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

photopériode, durée quotidienne de la période d'éclairement.

pourcentage (%), concentration exprimée en nombre de parties sur cent. *10 % d'une substance* représente 10 unités ou parties de la substance diluées dans un sédiment ou dans l'eau jusqu'à concurrence de 100 parties en tout. Selon la substance, la concentration s'exprime en pourcentage en masse de la substance sur la masse du mélange final de sédiment ou de solution finale, en pourcentage en masse sur le volume ou, encore, en pourcentage en volume sur le volume.

prétraitement, traitement d'un échantillon de sédiment ou d'une portion de cet échantillon, avant que les amphipodes n'y soient exposés.

salinité, quantité totale, en grammes, de solides en dissolution dans 1 kilogramme d'eau. Se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toute la matière organique. On peut également la mesurer directement, grâce à un salinimètre, un conductimètre ou par d'autres moyens (v. APHA *et al.*, 1995).

surveillance, vérification de la qualité, collecte et communication des données, effectuées de façon régulière (p. ex. quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle). Dans le présent rapport, s'applique à certaines variables biologiques ou variables relatives à la qualité de l'eau ou au prélèvement et à la mesure de la toxicité d'échantillons de sédiments.

Terminologie des substances ou matières d'essai

eau déchlorée, eau chlorée à l'origine (généralement eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.

eau de porosité (également dite *eau interstitielle*), eau occupant les interstices entre les particules de sédiment.

eau désionisée, eau qu'on a débarrassée des ions Ca^{++} et Mg^{++} par passage en colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

eau d'essai, eau recouvrant la couche de sédiment dans les enceintes expérimentales, c'est-à-dire l'*eau surnageante*. Désigne également l'eau servant à manipuler le sédiment, au besoin (p. ex. pour la préparation d'un sédiment artificiel ou de mélanges de sédiments enrichis ou pour le tamisage hydraulique) ou l'eau servant d'eau témoin ou de dilution pour les essais « n'utilisant que de l'eau » avec des toxiques de référence.

eau distillée, eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (de verre borosilicaté ou d'un autre matériau) pour en éliminer les impuretés.

eau reconstituée, eau désionisée ou distillée dans le verre, de grande pureté, à laquelle on a ajouté des composés chimiques de qualité « réactif ». L'eau douce ainsi obtenue devrait être exempte de contaminants et posséder le pH, l'alcalinité et la dureté recherchés. Ce peut également être une eau douce à laquelle on a ajouté du sel marin ou de la saumure d'eau de mer commerciale, en une quantité qui permet d'obtenir la salinité (et le pH) de l'eau de mer recherchée pour l'élevage d'organismes et pour la réalisation d'expériences (p. ex. une essai employant un sédiment estuarien).

eau surnageante, eau recouvrant le sédiment de l'enceinte expérimentale.

eau témoin ou de dilution, eau servant à la préparation d'une série de solutions filles d'un produit chimique d'essai ou eau servant de surnageant dans un essai toxicologique appliqué au sédiment ou servant d'eau témoin dans un essai utilisant de l'eau seulement et un toxique de référence. Est souvent l'eau dans laquelle on élève les organismes ou l'eau (surnageante) d'essai.

essai toxicologique de référence, essai toxicologique utilisant, dans le cadre d'une expérience de mesure de la toxicité d'un sédiment, un toxique de référence afin de se faire une idée de la sensibilité des organismes au moment où on évalue la substance d'essai ainsi que de la précision et de la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de la substance. Si les résultats s'écartent d'un intervalle normal établi, cela signifie que la sensibilité des organismes ainsi que la performance et la précision de l'essai sont douteuses. Le plus souvent, cet essai est effectué en l'absence de sédiment (essai « n'employant que de l'eau »), bien que l'on puisse, en l'occurrence utiliser un sédiment enrichi.

produit chimique, dans le présent rapport, tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourraient se retrouver associés à des sédiments ou à de l'eau ou y être mélangés ou ajoutés.

sédiment, matériau naturel formé de particules ayant été transportées dans l'eau puis s'étant déposées sur le fond. Peut également désigner un substrat artificiel, constitué de matières particulaires choisies (p. ex. du sable d'une granulométrie donnée, de la bentonite [argile], etc.) dans lequel les organismes soumis à l'expérience peuvent fouir.

sédiment contaminé, sédiment renfermant des concentrations de produit(s) chimique(s) qui posent une menace connue ou potentielle pour l'environnement ou la santé humaine.

sédiment d'essai, échantillon de sédiment complet, prélevé sur le terrain, dans un endroit que l'on croit contaminé par un ou plusieurs produits chimiques, et que l'on se propose d'utiliser dans des essais toxicologiques avec des amphipodes. Ce peut parfois être un échantillon de sédiment ou un mélange de sédiments enrichis (y compris un sédiment témoin et un sédiment de référence) utilisé dans l'essai.

sédiment de référence, échantillon, prélevé sur le terrain, d'un sédiment que l'on pense ne pas être contaminé, choisi pour ses propriétés (p. ex. granulométrie, densité et teneur en matières organiques totales), qui correspondent étroitement à celles du ou des échantillons du sédiment d'essai, sauf la teneur en contaminants chimiques. On le prélève souvent dans un endroit à l'abri de la contamination, mais généralement à proximité des endroits où on prélève le sédiment d'essai.

sédiment dopé, voir SÉDIMENT ENRICHI.

sédiment enrichi, sédiment (contaminé ou non) auquel, pour les besoins d'une expérience, on a ajouté une substance ou une matière d'essai, par exemple un produit chimique, un mélange de produits chimiques, de la boue de forage, des déblais contaminés, de la boue ou un sédiment contaminé, après quoi on a mélangé le tout à fond afin de l'homogénéiser dans tout le sédiment. Syn. SÉDIMENT DOPÉ.

sédiment entier, sédiment intact, auquel on expose les organismes d'essai. Ce n'est ni une forme ni un dérivé du sédiment tel que l'eau de porosité ni un sédiment remis en suspension.

sédiment non contaminé, sédiment qui ne contient pas de concentration de substance(s) pouvant causer des désordres observables chez les organismes d'essai, abréger leur survie ou ralentir leur croissance durant l'essai.

sédiment témoin, sédiment *non contaminé* par des concentrations d'un ou de plusieurs contaminants qui pourraient influer sur la survie, la croissance ou le comportement des organismes d'essai. Ce pourrait être un sédiment naturel provenant d'un endroit non contaminé ou un sédiment reconstitué. Il ne doit être additionné d'aucune matière ou substance d'essai et il doit permettre une survie acceptable (c'est-à-dire d'au moins 80 %) des organismes d'essai. Grâce à lui, on peut interpréter les résultats des essais toxicologiques portant sur un ou des sédiments d'essai. C'est aussi un sédiment que l'on peut enrichir chimiquement.

sédiment témoin dopé, voir SÉDIMENT TÉMOIN ENRICHI.

sédiment témoin enrichi, sédiment témoin non contaminé, auquel, pour les besoins d'une expérience, on a ajouté une substance ou une matière d'essai, par exemple un produit chimique, un mélange de produits chimiques, de la boue de forage, des déblais contaminés, de la boue ou un sédiment contaminé, après quoi on a mélangé le tout à fond afin de l'homogénéiser dans tout le sédiment. Syn. SÉDIMENT TÉMOIN DOPÉ.

solution mère, solution concentrée de la substance à mesurer. On ajoute des volumes mesurés de la solution mère à de l'eau de dilution afin de préparer des solutions filles à des dilutions données.

substance, type particulier de matière possédant des propriétés plus ou moins uniformes.

témoin, au cours d'une enquête ou d'une étude, variante reproduisant toutes les conditions et facteurs qui pourraient influer sur les résultats, sauf sur la condition particulière faisant l'objet de l'étude. Dans un essai toxicologique effectué sur le milieu aquatique, le témoin doit reproduire toutes les conditions d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de substance ou de matière d'essai ajoutée. Le témoin sert à déterminer l'absence de toxicité mesurable attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. température, santé des organismes soumis à l'essai ou effets dus à leur manipulation).

toxique de référence, produit chimique étalon servant à mesurer la sensibilité des organismes d'essai, afin d'établir le degré de confiance dans les résultats des essais toxicologiques employant une substance ou une matière d'essai. Dans la plupart des cas, l'essai toxicologique employant un toxique de référence sert à évaluer la sensibilité des organismes au moment où on étudie la substance ou la matière d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce produit.

Terminologie statistique et toxicologique

CEMO, v. CONCENTRATION AVEC EFFET MINIMAL OBSERVÉ.

CESO, v. CONCENTRATION AVEC EFFET DE SEUIL OBSERVÉ.

CIp, v. CONCENTRATION INHIBITRICE.

CI50, v. CONCENTRATION LÉTALE MÉDIANE.

coefficient de variation (CV), écart-type (σ) d'un ensemble de données d'un échantillon, en pourcentage de la moyenne. Se calcule comme suit :

$$CV\ (\%) = 100\ \sigma/\bar{x}.$$

concentration avec effet de seuil observé (CESO), moyenne géométrique de la concentration sans effet observé (CSEO) et de la concentration avec effet minimal observé (CEMO). Dans certains pays, on peut l'appeler *concentration maximale aceptable* de toxique. *Concentration chronique* ou *subchronique* pourraient convenir, selon la durée de l'essai.

concentration avec effet minimal observé (CEMO), concentration minimale de substance ou de matière causant, chez l'organisme qui y est exposé, des effets sublétaux observés et statistiquement significatifs. Par exemple, ce pourrait être la concentration minimale qui, à la fin de l'essai, correspond à un poids sec d'organismes exposés significativement inférieur au poids sec des organismes témoins.

concentration inhibitrice (CIp, p désignant le pourcentage d'effet), concentration estimative ponctuelle de la substance ou de la matière d'essai qui inhibe, selon le pourcentage précisé, une fonction biologique quantifiable telle que la croissance. Par exemple, la CI25 pourrait être la concentration qui, estime-t-on, réduit de 25 % le gain de poids sec des organismes d'essai, par rapport au poids sec des organismes témoins. La notion est à utiliser dans tout essai toxicologique mesurant un effet variant de façon continue, par exemple le poids sec à la fin de l'essai, la reproduction ou la respiration.

concentration létale médiane (CL50), concentration de substance ou de matière dans le sédiment (p. ex. en mg/kg) ou l'eau (p. ex. en mg/L) que l'on estime mortelle pour 50 % des organismes d'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % découlent habituellement de l'analyse statistique de la mortalité observée à au moins cinq concentrations, après une période fixe d'exposition. On doit préciser la durée de l'exposition (p. ex. CL50 après 96 h, pour un essai toxicologique de référence avec de l'eau seulement, ou CL50 après 14 j, pour un essai toxicologique de survie et de croissance d'*Hyalella azteca* mesurant la toxicité d'un sédiment).

concentration sans effet observé (CSEO), concentration maximale d'une substance ou d'une matière ne causant aucun effet sublétal observé et statistiquement significatif chez l'organisme exposé. Par exemple, ce pourrait être la concentration maximale à laquelle le poids sec à la fin de l'essai n'est pas significativement inférieur au poids sec des organismes témoins.

CSEO, v. CONCENTRATION SANS EFFET OBSERVÉ.

écart significatif minimal (ESM), l'écart entre les valeurs obtenues pour chaque variante (dans la présente méthode employant *H. azteca*, l'écart entre les poids moyens ou la mortalité moyenne) qui devrait exister avant que l'on puisse conclure qu'il existe un écart significatif entre les groupes. Cette valeur s'obtient au moyen de certains tests statistiques, y compris le *test de Dunnett*, qui est normalisé.

effet sublétal, effet nocif pour un organisme, mais en deçà de la concentration qui entraîne directement la mort au cours de l'essai.

ESM, v. ÉCART SIGNIFICATIF MINIMAL.

essai toxicologique, opération visant à déterminer l'effet d'une substance ou d'une matière sur un groupe d'organismes choisis (p. ex. *H. azteca*) dans des conditions précises. Appliqué au milieu aquatique, l'essai permet habituellement de mesurer : *a*) la proportion d'organismes touchés (*essai quantique*) ; et/ou *b*) le degré de l'effet observé (*essai quantitatif* ou *gradué*), après exposition à une substance ou à une matière (p. ex. un échantillon de sédiment) ou à un mélange (p. ex. de sédiments et de substances chimiques).

létal, qui cause directement la mort. Chez les amphipodes, la mort est l'interruption de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité (p. ex., absence de tremblement des pléopodes).

paramètre de mesure, variable (c'est-à-dire temps, réaction des organismes, etc.) indiquant la fin de l'essai ; mesure(s) ou valeur(s) dérivée(s) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex. CL50, CSEO, CEMO, CIp).

précision, mesure de la dispersion (c'est-à-dire de l'écart) de mesures répétées de la même quantité. Elle décrit la certitude entourant un résultat ou la petitesse de l'intervalle dans lequel se situe le résultat du calcul statistique d'un paramètre de mesure, par exemple la CIp.

renouvellement de l'eau, renouvellement de l'eau surnageante des enceintes expérimentales, de façon régulière et mesurée (p. ex. une ou deux fois par jour) pendant toute la durée de l'essai. Peut être manuel ou, ce qui permet le renouvellement périodique de l'eau surnageante à un rythme constant, automatisé.

répétition, chaque enceinte expérimentale renfermant le nombre prescrit d'organismes, exposés soit à une concentration de la substance ou de la matière d'essai ou à des essais témoins ou de référence. Un essai toxicologique constitué de cinq sous-échantillons d'un sédiment non dilué prélevé en quatre endroits (y compris un lieu de référence) sur le terrain plus les sous-échantillons d'un sédiment témoin exigerait 25 enceintes pour sa réalisation. Pour chaque variante (c'est-à-dire pour le lieu précis du prélèvement d'un sédiment ou, dans le cas d'un essai portant sur plusieurs concentrations d'un sédiment enrichi par l'ajout de contaminant), on compterait normalement au moins cinq enceintes expérimentales ou répétitions. La répétition est une unité expérimentale indépendante ; c'est pourquoi tout transfert d'organismes ou de matières d'une répétition à l'autre invalide l'essai.

sublétal, nocif pour les amphipodes, mais en deçà de la concentration qui entraîne directement la mort au cours de l'essai.

toxicité, capacité propre d'une substance ou d'une matière de provoquer des effets nocifs, létaux ou sublétaux, chez les organismes vivants.

Remerciements

Les auteurs de la présente méthode d'essai biologique sont D.J. McLeay (McLeay Environmental Ltd.), Victoria [C.-B.]) et K.E. Day (Direction de la conservation des écosystèmes aquatiques, de l'Institut national de recherche sur les eaux [INRE], Environnement Canada, Burlington [Ont.]).

Avec le concours de K. Conlan et d'E. Hendrycks, du Musée canadien de la nature (Ottawa [Ont.]), E.L. Bousfield (attaché de recherches, Royal British Columbia Museum, Victoria) a préparé la note taxonomique et les éléments d'histoire naturelle de l'annexe F. P. Hamr, S. Kirby et P. Gillis ont apporté leur concours aux essais et participé à la validation de la méthode, dans les laboratoires d'Environnement Canada à l'INRE, du Centre canadien des eaux intérieures (Burlington [Ont.]). J.B. Sprague (de Sprague Associates Ltd., de Salt Spring Island [C.-B.]) a rédigé, révisé ou amélioré les notes d'orientation sur la statistique.

*Le présent rapport se fonde sur des rapports antérieurs (publiés ou non) dans lesquels on décrit les modes opératoires et les conditions expérimentales utilisés aux États-Unis et au Canada pour l'élevage d'*Hyalella azteca *et pour la réalisation d'essais toxicologiques sur les sédiments à l'aide de cet amphipode dulcicole. Les auteurs se sont notamment inspirés des marches à suivre, des conditions précises d'élevage et des essais utilisant* H. azteca *que recommande l'EPA (USEPA, 1994a) ainsi que d'études intra- et interlaboratoires ultérieures utilisant* C. riparius, *réalisées par des chercheurs canadiens et américains (Milani et al., 1996). Pour ce qui concerne l'élaboration de la méthode et les études de validation (Milani et al., 1996), nous sommes particulièrement reconnaissants, pour leur participation et leur contribution, aux personnes et aux organismes suivants : D. Milani et S. Kirby (INRE) ; K. Doe (Environnement Canada, Moncton [N.-B.]) ; K. Holtze (B.A.R. Environmental Inc., Guelph [Ont.]) ; A. Putt (Springborn Laboratories Inc., Warehan [Maryland]) ; P. Riebel (Beak Consultants Ltd., Dorval [Qc]) et G. van Aggelen (Environnement Canada, North Vancouver [C.-B.]).*

En sa qualité de responsable scientifique, R.P. Scroggins (Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Gloucester [Ont.]) a fourni une orientation et un apport techniques au projet, durant toute sa réalisation. Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA, annexe A) ont participé à l'élaboration et à l'examen du rapport. Nous les en remercions. Nous tenons à souligner en particulier les nombreuses observations utiles formulées par chaque membre du comité d'experts scientifiques

d'Environnement Canada chargé de la première et de la dernière révision du rapport : G.T. Ankley (USEPA, Duluth [MN]) ; U. Borgmann (Pêches et Océans Canada, Burlington [Ont.]) ; G.A. Burton Jr. (université d'État Wright, Dayton [OH]) ; C.W. Hickey (NIWA Ecosystems, Hamilton [Nouvelle-Zélande]) ; C.G. Ingersoll (U.S. Geological Survey, Columbia [MO]) ; K. Liber (université du Wisconsin, Superior ([WI]) ; L. Maltby (université de Sheffield au Royaume-Uni) ; G. van Aggelen (Environnement Canada, North Vancouver). Trois des principaux auteurs du document USEPA (1994a), c'est-à-dire C.G. Ingersoll, G.T. Ankley et G.A. Burton, ont fait partie de ce comité.

Outre les membres du comité consultatif scientifique d'Environnement Canada qui ont contribué à l'élaboration de la méthode, les personnes suivantes ont relu l'ébauche finale et ont formulé de nombreuses observations utiles : J. Black (EA Eng. Sci. Tech. Inc., Sparks [MD]) ; D. Boersma (Direction des produits chimiques commerciaux, EC, Ottawa) ; R. Casey (Centre environnemental de l'Alberta, Vegreville) ; G. Dave (université de Göteberg, Suède) ; M.P. Hamer (Zeneca Agrochemicals, Bracknell, Berkshire [Royaume-Uni]) ; M.L. Hinman (Exxon Biomedical Sciences Inc., Millstone [NJ]) ; R.A. Hoke (SAIC, Hackensack [NJ]) ; J.W. Lazorchak (USEPA, Cincinnati [OH]) ; W. McCulloch (EA Eng. Sci. Tech. Inc., Sparks [MD]) ; B. McGee (université du Maryland, Queenstown) ; M.H. Murdoch (EVS Consultants Ltd., North Vancouver) ; C. Naylor (université de Sheffield [R.-U.]) ; A. Mueller (Fed. Biol. Res. Ctr. Agric., Kleinmachnow [Allemagne]) ; G. Pagano (Instituto Nazionale Tumori-Pondazione, Naples) ; F. Quiniou (IFREMER, Centre de Brest, Plouzané [France]) ; C. Roghair (Nat. Inst. Publ. Health & Environ. Prot., Bilthoven [Pays-Bas]) ; G.L. Stephenson (Ecological Services for Planning Ltd., Guelph [Ont.]) ; K. Taylor (Direction des produits chimiques commerciaux., Ottawa) ; A. Berbeek (Chemex Labs. Alberta Inc., Edmonton) ; L. Vigano (Instituto de Ricerca Sulle Acque, Milan) ; P. Winger (université de la Géorgie, Athens).

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais toxicologiques en milieu aquatique pour mesurer et contrôler les effets toxiques de substances ou de mélanges complexes de substances qui pourraient être nocives pour les organismes aquatiques indigènes présents dans l'environnement (eau et sédiments). Les résultats de ces essais peuvent révéler la nécessité de réglementer les rejets et de fixer des normes aux effluents ou trouver des applications dans la recherche et ailleurs. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou méthode réponde aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA, annexe A) a proposé un ensemble d'essais de mesure de la toxicité en milieu aquatique qui seraient généralement acceptables au Canada et qui permettraient de mesurer différents effets toxiques au moyen de diverses substances ou matières (p. ex. échantillons de produits ou de substances chimiques, d'effluents, d'eaux réceptrices ou de sédiments) et d'organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxonomiques.

En 1987, Environnement Canada et le GITA ont recommandé l'élaboration d'un ensemble cohérent de méthodes qui serviraient couramment à prévenir, à évaluer, à gérer et à réduire la contamination des sédiments (Sergy, 1987). Les laboratoires régionaux d'Environnement Canada (annexe B) ont alors entrepris une série d'études (McLeay *et al.*, 1989, 1991, 1992, 1993 ; Paine et McPherson, 1991a et b ; Doe et Wade, 1992 ; Yee *et al.*, 1992) afin d'élaborer et de valider une méthode normalisée d'essai biologique qui permettrait de mesurer la toxicité d'échantillons d'un sédiment contaminé. Cette méthode utiliserait au moins l'une des six espèces d'amphipodes marins ou estuariens communs aux eaux côtières du Pacifique ou de l'Atlantique (EC, 1992a). Le GITA a désigné, pour qu'il soit normalisé par Environnement Canada, un essai permettant de mesurer la toxicité des sédiments par la survie et la croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments. Cette méthode devait faire partie d'une série de méthodes d'essai biologique préparées par Environnement Canada afin d'aider à satisfaire aux exigences du Canada concernant l'évaluation et la protection de l'environnement. La vaste répartition et le caractère commun d'*H. azteca*, inféodé aux sédiments d'eau douce, de même que l'importance écologique de l'organisme, sa facilité d'élevage et de manipulation au cours des essais, sa croissance rapide, son cycle biologique court, sa sensibilité aux contaminants des sédiments, son utilisation répandue dans la mesure de la toxicité des sédiments, toutes ces raisons ont présidé au choix de cet organisme.

Traditionnellement, les chercheurs canadiens ont diversement utilisé des échantillons de sédiments d'eau douce et *H. azteca* dans leurs études. Mentionnons celles qu'ont publiées Borgmann et Munawar (1989), Borgmann *et al.* (1989) et l'ASTM (1991a et 1993), de même que les modes opératoires

normalisés, mais non publiés, de l'Institut national de recherche sur les eaux (NWRI, 1992). D'autres méthodes d'élevage et d'utilisation d'*H. azteca* à des fins de surveillance ont inspiré la présente méthode, notamment celles de de March (1981), de la FDA (1987), d'Ingersoll et Nelson (1990), de l'USEPA (1991a et b), de Pêches et Océans [DFO] (1992), d'Ankley *et al.* (1993a), de Brooke *et al.* (1993), de Kubitz (1993a et b), de Norberg-King (1992) et de Smith *et al.* (1991a et b).

En 1994, l'USEPA (Environmental Protection Agency des États-Unis) a publié de nouvelles méthodes de mesure de la toxicité des sédiments imputable aux contaminants, y compris un essai utilisant un échantillon de sédiment entier et *H. azteca*[1] (USEPA, 1994a). Le Comité E47 de l'ASTM (ASTM, 1995a) a adopté ces essais comme méthodes normalisées. La présente méthode élaborée par EC s'inspire fortement des modes opératoires d'élevage et d'essai d'*H. azteca* énoncés dans USEPA (1994a). Différence de taille, cependant, l'essai employant *H. azteca* que décrivent USEPA (1994a) et ASTM (1995a) dure 10 j et il est axé sur la survie de l'amphipode, tandis que la méthode d'Environnement Canada dure 14 j et porte sur *la survie et la croissance*. En outre, la présente méthode est assortie de deux options : (1) renouvellement périodique, deux fois par jour, de l'eau recouvrant le sédiment des enceintes expérimentales, conformément au mode opératoire de l'USEPA (1994a) et de l'ASTM (1995a), normalement sans aération de cette eau ; (2) conditions statiques, sans renouvellement (sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation), mais avec aération continue de l'eau surnageante. Dans les deux cas, on nourrit les organismes avec un mélange normalisé de levure, de *Cerophyll*[MC] et d'aliment pour truite (LCT), soit chaque jour, à raison de 1,5 mL (ce qui équivaut à 2,7 mg de poids sec), soit trois fois par semaine, au cours de journées non consécutives, à raison de 3,5 mL (environ 6,3 mg, poids sec).

Nous décrivons les méthodes universelles de préparation et de réalisation des essais toxicologiques appliqués aux sédiments et utilisant *H. azteca*. Nous présentons également les conditions et les modalités précises à suivre ou recommandées pour l'évaluation de différents types de substances ou de matières (p. ex. échantillons de sédiment prélevés sur place ou de déchets particulaires ou, encore, échantillons d'au moins une substance ou produit chimique mélangé expérimentalement à un sédiment naturel ou reconstitué ou mis en contact avec ce dernier).

L'organigramme de la figure 1 donne un aperçu général des sujets universels que nous abordons et il énumère les sujets propres aux échantillons de sédiment prélevés sur le terrain, aux échantillons de déchets particulaires semblables (p. ex. boue, boue de forage ou déblais de dragage) ou, encore, aux échantillons de sédiment enrichi expérimentalement d'une substance ou de plusieurs substances, de sédiment contaminé ou de déchets particulaires. Nous avons élaboré la méthode après examen des variantes des méthodes d'élevage et d'essai

1. Préparé par le United States Freshwater Sediment Toxicity Assessment Committee, ce rapport (USEPA [1994a], reflétait le consensus des chercheurs américains et canadiens activement engagés dans les dosages biologiques de la toxicité des sédiments à l'aide d'*H. azteca* (Ingersoll, 1992 ; Norberg-King, 1992 ; Burton et Ingersoll, 1994 ; Ingersoll *et al.*, 1995 ; Burton *et al.*, 1996).

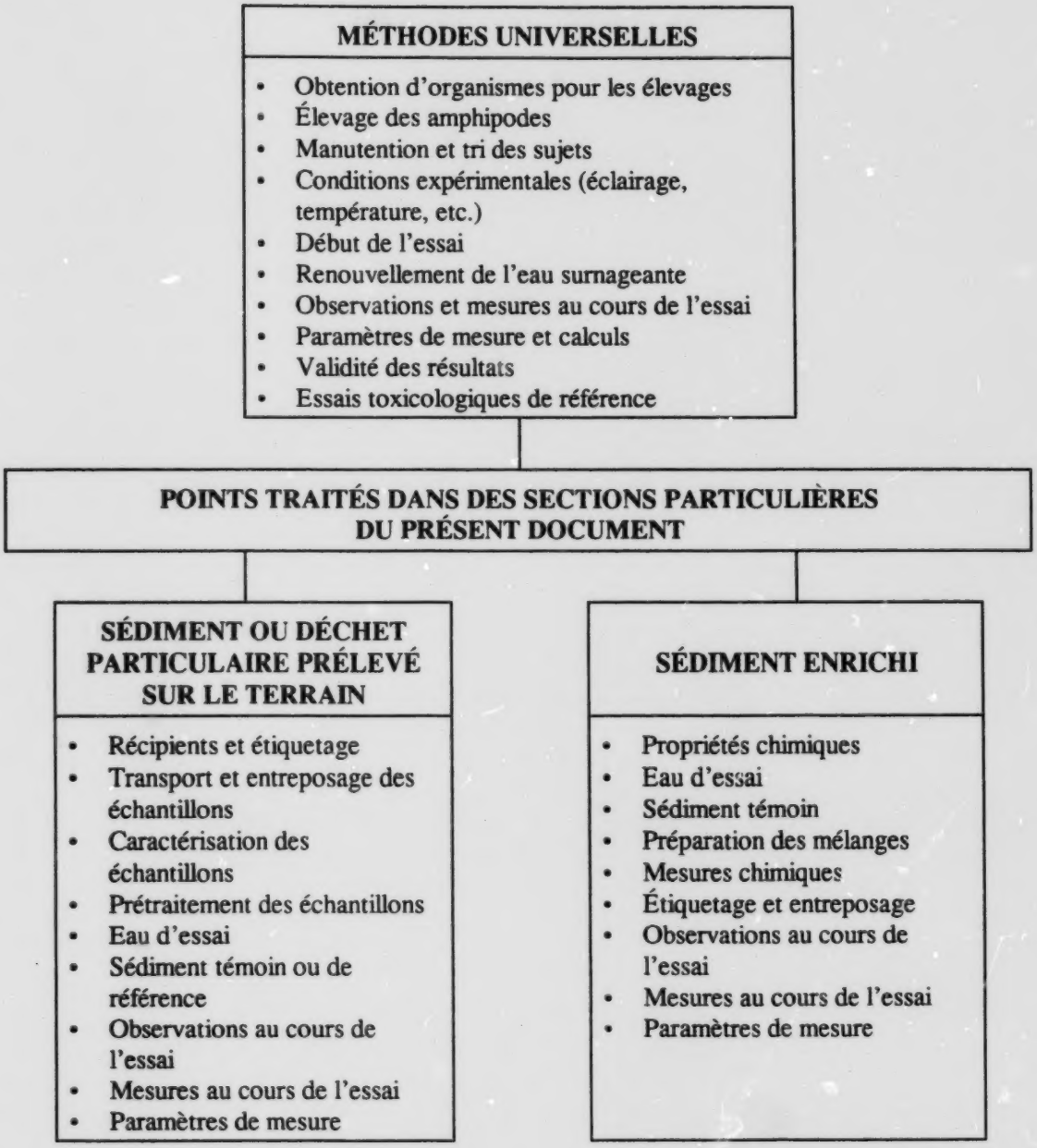


Figure 1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais toxicologiques avec *Hyalella azteca* et divers types de matières ou de substances

énoncées dans les méthodes[2] canadiennes et américaines décrivant la préparation et la réalisation des essais toxicologiques appliqués aux sédiments et utilisant l'amphipode dulcicole *H. azteca*. L'annexe C résume les variantes actuelles et antérieures des méthodes d'élevage de cette espèce ainsi que de récolte des jeunes sujets pour les essais toxicologiques. L'annexe D, résume les variantes actuelles ou antérieures des essais de croissance, de survie ou des deux pour la détermination de la toxicité d'un sédiment à l'aide d'*H. azteca*. L'annexe E résume les variantes interlaboratoires des conditions et des marches à suivre des essais toxicologiques de référence utilisant *H. azteca*.

Les paramètres biologiques de mesure de la méthode sont le pourcentage moyen de survie et le poids sec moyen (lequel est un indice de la croissance) à la fin des 14 j de l'essai. La méthode est destinée à l'évaluation de la toxicité d'échantillons des matières suivantes :

(1) sédiments d'eau douce prélevés sur le terrain ;

(2) boues industrielles ou urbaines et déchets particulaires semblables qui pourraient influer sur l'environnement dulcicole ;

(3) mélange d'au moins un produit ou une substance chimique, dans la masse des sédiments d'eau douce ou les recouvrant.

---

2. Pour préparer les listes des variantes des marches à suivre (v. annexes C, D et E), nous avons notamment utilisé les documents suivants : guides pratiques publiés, modes opératoires normalisés, mais inédits, des établissements et laboratoires de l'État ainsi qu'ébauches de rapports. Nous les énumérons dans ces annexes sous le nom de l'organisme dont ils émanent, plutôt que sous celui de l'auteur. Cependant, nous y donnons le nom de l'auteur et les renvois officiels.

Environnement Canada (1997a) a également mis au point un essai d'une durée de 10 j pour mesurer les effets toxiques de ces matières sur la survie et la croissance de larves de chironomes dulcicoles (*Chironomus tentans* ou *C. riparius*). L'essai peut servir en même temps que la présente méthode ou la remplacer. La présente méthode peut également servir à mesurer et à évaluer la toxicité des contaminants dans les sédiments estuariens ou la toxicité de mélanges de produits chimiques et de sédiments de milieux où la salinité de l'eau surnageante (recouvrant le sédiment) ou de l'eau de porosité n'excède pas 15 ‰ (Nebeker et Miller, 1988 ; USEPA, 1994a). On utilise normalement la méthode d'Environnement Canada employant au moins l'une des espèces recommandées d'amphipodes estuariens ou marins communs aux eaux côtières de l'Atlantique ou du Pacifique au Canada (EC, 1992a) pour mesurer et évaluer la toxicité des contaminants dans les sédiments estuariens ou marins.

En formulant ces modes opératoires, nous nous sommes efforcés de trouver le juste milieu entre les considérations scientifiques et pratiques ainsi que les coûts, tout en nous assurant que les résultats seront assez précis pour la plupart des situations auxquelles on les appliquera. Nous posons que l'utilisateur possède une certaine connaissance des essais toxicologiques appliqués au milieu aquatique. Nous ne fournissons pas les explications qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire, bien que le présent document se veuille un guide utile à cette application et à d'autres.

Pour savoir comment appliquer la méthode et d'autres méthodes biologiques ainsi que pour se renseigner sur l'interprétation et

l'application des paramètres de mesure, prière de consulter Environnement Canada (1977b).

1.2 Identification, répartition, cycle biologique

Hyalella azteca (Saussure) est un amphipode détritivore épibenthique et fouisseur des sédiments d'eau douce. Nous décrivons et montrons les caractéristiques de ce petit crustacé (le mâle mesurant jusqu'à 8 mm, la femelle atteignant 6 mm) dans l'annexe F.

H. azteca vit dans les cours d'eau paresseux, les lacs et les étangs tempérés. Il est inféodé à la couche supérieure de 1 ou de 2 cm des sédiments. Dans les habitats qu'il préfère, sa densité a atteint plus de 10 000 sujets au mètre carré. On peut également le trouver, en nombres moins élevés, dans les terrains marécageux, les fossés, les sources, les cours d'eau et les marécages (USEPA, 1994a). L'espèce est largement distribuée en Amérique du Nord : on l'a trouvée dans les sédiments superficiels des lacs du Guatemala et des Antilles jusqu'à Inuvik, dans les Territoires du Nord-Ouest (de March, 1981). L'annexe F renferme des renseignements sur la distribution connue d'*H. azteca* dans les eaux canadiennes et sur son habitat.

Les amphipodes sont un élément important des communautés benthiques des milieux dulcicoles, estuariens et marins d'Amérique du Nord. Les amphipodes dulcicoles, y compris *H. azteca*, sont une importante source de nourriture pour de nombreux poissons, oiseaux aquatiques, échassiers, salamandres et gros invertébrés (de March, 1981). *H. azteca* ingérerait de façon sélective les bactéries et les algues adhérant aux particules de sédiment de moins de 65 µm (Hargrave, 1970). Sa reproduction est sexuée. La femelle porte les œufs et les jeunes dans un marsupium, sur sa face ventrale. Immédiatement avant l'accouplement, elle mue et libère la progéniture de l'accouplement antérieur. Selon sa taille et son état de santé, elle peut ainsi produire et libérer chaque fois de 1 à 50 jeunes. À 25 °C, *H. azteca* atteint la maturité sexuelle en 28 à 33 j (de March, 1981 ; USEPA, 1991a et b). Pour plus de renseignements sur le cycle biologique de l'espèce, consulter l'annexe F.

1.3 Emploi antérieur dans les essais toxicologiques

Burton (1991) donne un excellent survol des diverses méthodes ayant servi à déterminer la toxicité des sédiments d'eau douce, y compris des essais employant *H. azteca* et d'autres amphipodes. Nebeker *et al.* (1984) ont d'abord recommandé des essais étalés sur une partie du cycle biologique d'*H. azteca*, afin de mesurer la toxicité des sédiments contaminés d'eau douce. Nebeker et Miller (1988) ont montré que l'amphipode survit et se reproduit si, dans les enceintes expérimentales, les sédiments estuariens sont recouverts d'eau douce. Ultérieurement, on a montré qu'on pouvait élever *H. azteca* dans une eau de 15 ‰ de salinité, taux alors utilisé dans les essais toxicologiques appliqués aux rejets en milieu estuarien (Ingersoll *et al.*, 1992) ou aux sédiments estuariens contaminés (McGee *et al.*, 1993). L'USEPA et la United States Army Corps of Engineers (USACE) ont recommandé l'emploi d'*H. azteca* pour l'évaluation des déblais de dragage qu'on envisage d'immerger dans les eaux intérieures et côtières (USEPA / USACE, 1994). Ingersoll *et al.* (1995) ont examiné la méthodologie et

l'application des essais de mesure de la toxicité des sédiments avec *H. azteca*.

H. azteca a servi aux essais de mesure de la toxicité aiguë et chronique de l'*eau uniquement*, en présence de divers produits chimiques (FDA, 1987 ; Borgmann et Munawar, 1989 ; Borgmann *et al.*, 1989, 1990, 1991, 1993 ; Borgmann, 1994 ; Schubauer-Berigan *et al.*, 1993 ; Hoke *et al.*, 1995 ; Phipps *et al.*, 1995). Les paramètres biologiques de ces essais ont notamment été la survie, la croissance et le succès de la reproduction, au bout d'une partie ou de la totalité du cycle biologique (12 à 14 semaines à 25 °C). On a également utilisé *H. azteca* pour mesurer, dans l'*eau seulement*, la bioaccumulation de certaines substances chimiques (Borgmann *et al.*, 1990, 1991, 1993). Plusieurs chercheurs ont étudié la toxicité et la bioaccumulation des substances chimiques ajoutées au sédiment (*sédiment enrichi*) à l'aide d'*H. azteca* (Landrum et Scavia, 1983 ; Cairns *et al.*,1984 ; Nebeker *et al.*, 1986, 1989 ; Smith *et al.*, 1992a ; Suedel *et al.*, 1993a et b ; Kubitz *et al.*, 1995 ; Milani *et al.*, 1996 ; Whiteman *et al.*, 1996).

Beaucoup de chercheurs ont utilisé avantageusement *H. azteca* pour évaluer la toxicité d'échantillons entiers de sédiment d'eau douce (p. ex. Nebeker *et al.*, 1984 ; Borgmann et Munawar, 1989 ; Burton *et al.*, 1989 ; Ingersoll et Nelson, 1990 ; Ankley *et al.*, 1993a et b ; Borgmann et Norwood, 1993 ; Kubitz, 1993a ; Kubitz *et al.*, 1993 ; Sibley *et al.*, 1993 ; West *et al.*, 1993 ; Burton et Ingersoll, 1994 ; Burton *et al.*, 1996 ; Kemble *et al.*, 1994 ; Pastorok *et al.*, 1994 ; Becker *et al.*, 1995 ; Ingersoll *et al.*, 1995 ; Kubitz *et al.*, 1995, 1996 ; Reynoldson *et al.*, 1995 ; Milani *et al.*, 1996). Les paramètres biologiques de mesure de ces essais, qui peuvent servir à évaluer la variation spatio-temporelle de la toxicité d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain, sont ordinairement le taux moyen de survie et de croissance (en longueur ou en poids) à la fin de l'essai. Dans les essais toxicologiques avec extraits aqueux (eau de porosité et/ou élutriats) de sédiments d'eau douce, on a également employé *H. azteca* (Burton *et al.*, 1989 ; Ankley *et al.*, 1991 ; Schubauer-Berigan et Ankley, 1991 ; Sibley *et al.*, 1993).

Il y a peu, on a examiné les résultats d'essais de mesure de la toxicité des sédiments en laboratoire à l'aide d'*H. azteca*, afin d'en évaluer l'utilité pour localiser les populations benthiques naturelles touchées par la présence des contaminants toxiques dans les sédiments (Becker et Bigham, 1993 ; Burton et Ingersoll, 1994 ; Canfield *et al.*, 1994 ; Schlekat *et al.*, 1994). Ces *études de validation* sur le terrain intègrent habituellement les résultats d'essais toxicologiques en laboratoire, d'analyses chimiques simultanées des échantillons de sédiment et de relevés sur le terrain de la diversité et de l'abondance des communautés benthiques, par l'approche dite de la *triade de qualité des sédiments* (Chapman *et al.*, 1986, 1987, 1991) ou une approche semblable. Jusqu'à ce jour, les études intégrées en laboratoire et sur le terrain englobant des mesures de la toxicité d'un sédiment à l'aide d'*H. azteca* ou d'autres amphipodes se sont révélées pouvoir donner une indication fiable de la contamination nocive des sédiments sur le terrain (Swartz *et al.*, 1982, 1985a, 1986, 1994 ; Becker *et al.*, 1990 ; Canfield *et al.*, 1994 ; USEPA, 1994a ; Day *et al.*, 1995a).

1.4 Tolérance et sensibilité relative en laboratoire

Un certain nombre de chercheurs ont examiné en laboratoire la tolérance d'*H. azteca* à certaines variables du milieu naturel. L'effet de la température sur la tolérance, le comportement et la biologie de la reproduction de ces animaux est résumé dans de March (1981). *H. azteca* tolère naturellement la gamme de températures de 0 à 33 °C. En général, la production maximale de jeunes se situe entre 26 et 28 °C, tandis que les températures de 33 à 37 °C sont mortelles. De 0 à 10 °C, on assiste à l'immobilisation complète des animaux ; les températures de 10 à 18 °C retardent la maturation, abaissent le taux de reproduction et donnent de gros adultes ; à partir de 20 °C, on observe l'accélération de la maturation, l'augmentation du taux de reproduction et l'obtention de petits adultes (de March, 1981).

Au laboratoire, *H. azteca* se reproduit bien et de façon continue si la photopériode est d'au moins 16 h. Si elle est plus courte (inférieure ou égale à 12 h), une pause interrompt la reproduction (de March, 1977). On a réussi l'élevage d'*H. azteca* à l'aide d'un éclairage fluorescent en spectre large, d'une intensité d'environ 500 à 1 000 lux (Ingersoll et Nelson, 1990 ; Ankley *et al.*, 1991 ; USEPA, 1994a). Le fait de couvrir les récipients d'élevage d'une feuille d'aluminium n'a pas influé sur la survie, mais cela a ralenti la croissance et supprimé la reproduction (Borgmann *et al.*, 1989).

H. azteca peut survivre à une longue exposition à de faibles concentrations d'oxygène dissous (OD). De March (1981) a résumé les études selon lesquelles l'espèce pouvait survivre dans l'eau stagnante et il a cité deux études indépendantes signalant une CL50 après 48 h de 0,7 mg d'O_2 par litre pour cette espèce. Nebeker *et al.* (1992) ont également constaté que l'animal pouvait survivre à une exposition brève ou prolongée à de faibles concentrations d'OD ; les CL50 après 96 h et 30 j étaient inférieures à 0,3 mg d'O_2/L. Toutefois, après 30 j d'exposition à une eau dans laquelle la concentration d'O_2 ne dépassait pas 1,2 mg/L, on a observé le ralentissement de la croissance et une baisse de la reproduction (nombre moyen de jeunes). Nebeker *et al.* (1992) n'ont pas examiné l'effet d'une concentration plus élevée (mais inférieure aux concentrations de saturation) de l'OD sur la croissance et la reproduction d'*H. azteca*.

On possède peu de renseignements sur l'influence du pH sur la survie d'*H. azteca*. De March (1979) signale que la survie de l'espèce est optimale aux pH de 6 à 8 et que, dans la gamme des pH de 4 à 5, la mortalité augmente graduellement. On ne sait pas s'il existe des renseignements sur les effets qu'exerce l'eau douce de pH différents sur la vitesse de croissance ou la réussite de la reproduction de cet amphipode.

On possède peu de renseignements concluants sur l'influence de la dureté ou de l'alcalinité de l'eau sur le bien-être d'*H. azteca*. L'USEPA (1991b) a observé que le succès de la reproduction de cette espèce était souvent faible dans une eau reconstituée, réglée à une faible dureté au moyen de recettes classiques (p. ex. dans USEPA, 1985a et b, 1991c). Toutefois, le problème pourrait avoir été attribuable à un déséquilibre chimique des ions en solution pour l'espèce plutôt qu'à la dureté même de l'eau ; par la suite, une recette d'eau reconstituée d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ au litre a donné des résultats meilleurs (mais non universels) [USEPA,

1994a ; v. § 2.3.4]. Il faut poursuivre les travaux pour déterminer les intervalles de dureté et d'alcalinité de l'eau qui conviennent à l'élevage et à l'emploi d'*H. azteca* dans les essais.

H. azteca s'est révélé euryhalin : on a réussi à l'élever ou à l'utiliser dans des essais dans de l'eau et des sédiments estuariens. Utilisant des sujets acclimatés à l'eau douce, Nebeker et Miller (1988) signalent que la CL50 après 10 j de diverses salinités varie de 19 à 24 ‰, selon l'âge (jeunes adultes ou adultes à maturité), tandis que la CL50 après 24 h varie de 16 à 19 ‰ chez les adultes à maturité. Chez les organismes acclimatés à l'eau douce, l'inhibition de la reproduction (c'est-à-dire du nombre de jeunes) est évidente aux salinités d'au moins 10,4 ‰ (Nebeker et Miller, 1988). On peut présumer que les sujets toléreraient plus la salinité si on les acclimatait préalablement à l'eau estuarienne. De March (1981) a fait observer qu'*H. azteca* peut survivre à une salinité de 30 ‰, si on l'y acclimate graduellement. D'autres études ont montré qu'on peut élever *H. azteca* dans une eau de 15 ‰ de salinité ou moins (McGee *et al.*, 1993 ; USEPA, 1994a).

On a examiné l'influence des propriétés physico-chimiques naturelles des sédiments sur les performances d'*H. azteca*, dans le dosage biologique de la toxicité des sédiments. Ingersoll et Nelson (1990) ont constaté la tolérance extrêmement large de l'espèce à la granulométrie des sédiments. Au bout d'une longue exposition à des sédiments propres dont la composition variait de plus de 90 % de particules limoneuses et argileuses à 100 % de particules sableuses, on n'a observé aucun effet négatif, ni sur la survie ni sur la croissance. De même, Ankley *et al.* (1994) ont exposé pendant 10 j *H. azteca* à 50 échantillons non contaminés de sédiment lacustre dont la granulométrie variait de 95 % d'argile à 100 % de sable et dont la teneur en carbone organique variait de 0,3 à 8,1 %. Ils n'ont constaté aucune corrélation entre les caractéristiques du sédiment, notamment sa granulométrie, sa teneur en carbone organique ou sa composition minéralogique et le taux de survie de l'amphipode, à la condition d'avoir nourri ce dernier au cours des essais. Au bout d'essais de survie d'une durée de 10 j avec des sédiments reconstitués en laboratoire ou des sédiments propres naturels, Suedel et Rodgers (1994a) ont déterminé qu'*H. azteca* tolérait toutes les compositions granulométriques (jusqu'à 100 % de sable, 100 % de limon et 60 % d'argile) et la fourchette expérimentale de la teneur en carbone organique (0,1 à 8,0 %). Au bout d'essais d'une durée de 48 h avec des sédiments enrichis d'une gamme de concentrations de sulfonate d'alkylbenzène, Cano *et al.* (1996) ont constaté que l'adjonction de mousse de sphaigne au sédiment augmentait la tolérance à la concentration létale aiguë de ce surfactif lorsque la teneur en carbone organique total était d'au moins 1,5 %.

On a comparé, en s'appuyant sur diverses études, la sensibilité d'*H. azteca* aux sédiments ou aux substances chimiques, à celle d'autres espèces dulcicoles souvent utilisées dans les essais toxicologiques. On constate ainsi qu'*H. azteca* est l'une des espèces les plus sensibles (Burton, 1991 ; USEPA, 1994a). La concentration létale aiguë, dans l'eau seulement, d'un certain nombre d'effluents industriels montre que la sensibilité d'*H. azteca* est semblable à celle de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) [Maciorowski, 1975]. De même, la

tolérance d'*H. azteca* (au bout de 96 h) à la concentration létale aiguë de KCl, toxique de référence, dans l'eau uniquement s'est révélée semblable à celle de la daphnée dulcicole *Ceriodaphnia dubia* (au bout de 48 h) [Smith *et al.*, 1991b]. Dans des essais comparatifs de mesure de la toxicité létale aiguë de l'eau de porosité ou d'élutriats de sédiment, *H. azteca* a été au moins aussi sensible que *C. dubia* ou que les larves de tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le ver oligochète *Lumbriculus variegatus* ayant été le moins sensible (Ankley *et al.* [1991]). L'exposition chronique d'*H. azteca*, d'un autre amphipode (*Gammarus fasciatus*) ou de *Daphnia magna* au cadmium et au pentachlorophénol dans l'eau seulement a montré que la sensibilité des deux amphipodes était semblable et que chaque espèce était au moins aussi sensible que *D. magna* (Borgmann *et al.*, 1989). Dans un essai d'une durée de 10 j, dans l'eau seulement et avec un sédiment enrichi en fluoranthène, *H. azteca* et les larves du chironome *Chironomus tentans* se sont révélés deux fois plus sensibles que *D. magna* dans le premier milieu, tandis qu'*H. azteca* a été au moins aussi sensible que les deux autres espèces dans le second (Suedel *et al.*, 1993a). Dans une étude de la CL50 dans l'eau seulement, avec *H. azteca*, *C. tentans* et *L. variegatus* exposés séparément à cinq métaux et à cinq pesticides, Phipps *et al.* (1995) ont constaté qu'aucune espèce n'était constamment plus sensible à tous les toxiques, bien qu'*H. azteca* se soit révélé la plus sensible aux cinq métaux. Ayant en outre comparé les CL50 pour *H. azteca* aux valeurs publiées sur d'autres espèces aquatiques exposées aux mêmes substances, ils ont observé que l'amphipode était souvent parmi les plus sensibles (Phipps *et al.*, 1995). Des essais comparatifs de Kubitz *et al.* (1995), à l'aide de sédiments ou d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain puis enrichis en cuivre, des essais de mesure, au bout de 48 h, de la survie de *D. magna* ou de *Ceriodaphnia dubia* à l'eau de porosité, des essais d'inhibition enzymatique d'une durée d'une heure utilisant *D. magna* et des essais de mesure de la survie et de la croissance d'*H. azteca* après exposition de 14 j aux sédiments ont tous montré que, comme paramètres de mesure, la croissance d'*H. azteca* et l'inhibition enzymatique chez *D. magna* étaient plus sensibles que la survie.

Au bout d'essais de 10 j sur des sédiments entiers prélevés sur le terrain, West *et al.* (1993) ont constaté qu'*H. azteca* était plus sensible que *C. tentans* et que *L. variegatus*. Cités par l'USEPA (1994a), Kemble *et al.* (1994) ont comparé la sensibilité d'*H. azteca*, de *Chironomus riparius*, de *D. magna* et de la truite arc-en-ciel à des échantillons de sédiment contaminé par des métaux. D'après la longueur des sujets, leur maturation sexuelle et leur taux de survie au bout de 28 j, *H. azteca* s'est révélé la plus sensible des quatre espèces (et le paramètre de mesure le plus sensible s'est révélé la longueur). Selon une étude distincte d'un sédiment contaminé des Grands lacs, *H. azteca* était parmi les 24 organismes les plus sensibles et les plus discriminants (Burton et Ingersoll, 1994 ; USEPA, 1994a). Smith *et al.* (1993) ont montré que les larves du tête-de-boule (essai de 7 j) pourraient être plus sensibles qu'*H. azteca* à certains sédiments naturels contaminés par des métaux et des métalloïdes (sélénium).

Organismes d'essai

2.1 Espèces et stade

La présente méthode biologique utilise l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca*. Ce crustacé fouisseur est un détritivore épibenthique inféodé aux sédiments d'eau douce. Son identification devrait être confirmée et étayée par des experts en la matière, à l'aide des caractéristiques taxonomiques décrites et illustrées dans l'annexe F.

Il faut plus précisément utiliser des jeunes de 2 à 9 j, élevés en laboratoire. Pour une plus grande normalisation des sujets et des mesures de la croissance, il est souhaitable, bien que cela ne soit pas toujours pratique, d'utiliser des groupes d'un âge plus homogène (v. § 2.3.10).

2.2 Origine et acclimatation

Tous les amphipodes utilisés dans un essai doivent provenir de la même population. Les géniteurs dont on a besoin pour établir des élevages (v. § 2.3) peuvent provenir de laboratoires de l'État ou de laboratoires privés, qui élèvent *H. azteca* en vue d'essais toxicologiques appliqués aux sédiments. Ils peuvent également provenir du commerce [3].

On peut obtenir des géniteurs des fournisseurs canadiens suivants :

Laboratoire de toxicologie
Section de la qualité de l'environnement
Centre des sciences de l'environnement
Environnement Canada
C.P. 23 005
Moncton (N.-B.) E1A 6S8

Section de la toxicologie aquatique
Centre de la science environnementale du Pacifique
Environnement Canada
2645, route Dollarton
North Vancouver (C.-B.) V7H 1V2

Pour obtenir des adresses de fournisseurs américains, consulter USEPA (1994a ; tableau 10.1).

On devrait expédier les reproducteurs au laboratoire dans l'eau de même origine que leur eau d'élevage. Cette eau devrait être bien oxygénée (saturée à 90 à 100 %) avant l'expédition et il faudrait fournir aux animaux un substrat convenable (§ 2.3). On devrait isoler les récipients afin de réduire au minimum les variations de température au cours du transport. Par un transport rapide, on devrait assurer une livraison sans délai (c'est-à-dire dans les 24 h) des organismes vivants. Les récipients ne seront pas surpeuplés, afin de réduire au minimum le stress et de prévenir le déficit d'oxygène au cours du transport.

3. Des chercheurs pourraient s'inquiéter des effets d'une consanguinité excessive dans les élevages de laboratoire ou souhaiter utiliser la progéniture d'organismes d'une localité particulière. On peut donc établir des élevages à partir de populations sauvages. Dans ce cas, il faudrait confirmer la taxonomie des sujets, les élever pendant plusieurs générations et en évaluer la sensibilité à un ou à des toxiques de référence avant d'en utiliser la progéniture dans des essais toxicologiques. On devrait éviter de se procurer des populations sauvages en vue d'essais, à moins d'avoir démontré qu'elles peuvent se croiser avec des populations existantes de laboratoire (USEPA, 1994a).

À l'arrivée des sujets au laboratoire, on devrait les conserver dans l'eau dans laquelle ils ont été transportés, pendant qu'on en règle la température, ou les transférer dans une eau bien oxygénée, réglée à la température de l'eau du récipient d'expédition. On recommande d'exposer graduellement les organismes à l'eau dans laquelle on les élèvera, dans les cas où sa qualité (p. ex. dureté, pH, conductivité) présente un saut marqué. On pourrait aussi suivre les conseils sur l'acclimatation à l'eau d'essai (du § 4.1), quand on transférera des amphipodes de l'extérieur à l'eau d'élevage.

On devrait régler l'eau à la température fixée d'élevage (23 °C [§ 2.3]), graduellement, sans dépasser 2 °C/j (USEPA, 1994a). Durant l'acclimatation, on devrait aérer modérément l'eau qui a servi à garder les géniteurs. Pendant cette période intérimaire d'acclimatation des géniteurs aux conditions de laboratoire, les autres paramètres devraient être aussi semblables que possible à ceux dont on s'est servi pour maintenir les élevages (§ 2.3).

2.3 Élevage

2.3.1 Généralités

Le présent paragraphe renferme des conseils et des recommandations généraux pour l'élevage d'*H. azteca* en vue de la mesure de la toxicité des sédiments. Sachant que ce qui fonctionne bien dans un laboratoire risque de décevoir dans un autre laboratoire (USEPA, 1994a), on laisse beaucoup de détails précis de l'élevage, notamment le choix des conditions de renouvellement de l'eau, du substrat, du type d'aliment et de la ration, à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire. Pour décider si les organismes conviennent aux essais et si les résultats des essais sont acceptables, on se sert de critères de performances[4]. Pour convenir aux essais, les élevages doivent être frappés d'un faible taux de mortalité, les organismes doivent sembler en bonne santé, présenter un comportement normal pour la quête de nourriture et d'autres activités et avoir entre 2 et 9 j au début de l'essai. Il faudrait également démontrer l'acceptabilité de l'élevage par des essais parallèles ou permanents à l'aide d'au moins un toxique de référence (§ 4.8). On devrait écarter tout lot d'organismes qui ne satisfait pas à ces critères.

Il revient au laboratoire de démontrer sa capacité d'obtenir des résultats constants, précis, à l'aide d'au moins un toxique de référence, lorsqu'il se prépare à des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'*H. azteca*. À cette fin, il devrait déterminer sa précision intralaboratoire, qu'exprime le coefficient de variation des CL50, par au moins cinq essais, chaque fois avec différents lots d'organismes de même origine, le même toxique de référence, un mode opératoire et des conditions identiques (v. § 4.8) [USEPA, 1994a]. Il devrait aussi confirmer la précision actuelle de ses essais, par au moins cinq essais de survie et de croissance de différents lots d'organismes, d'une durée de 14 j, dans des sédiments témoins (USEPA, 1994a). Les conditions et les modes opératoires de ces essais initiaux devraient être identiques et conformes aux exigences de la section 4.

Dans un programme de mesures courantes de la toxicité des sédiments à l'aide d'*H. azteca*, il faudrait mensuellement

---

4. Les critères de performances comprennent : la survie et l'état des organismes d'élevage destinés à l'essai (§ 2.3.11) ; les conditions de validation de l'essai par les organismes témoins (§ 4.2) ; le comportement de groupes d'organismes dans des essais toxicologiques de référence (§ 4.8).

effectuer des essais de référence à l'aide des organismes élevés dans le laboratoire, en se conformant aux conditions et aux modes opératoires énoncés au § 4.8. Sinon, on devrait, au moyen d'un essai parallèle, évaluer la performance de sujets provenant de l'élevage utilisé pour mesurer la toxicité d'un sédiment. En outre, on devrait vérifier à l'aide d'un essai toxicologique de référence les performances de tout élevage venant d'être établi à l'aide de nouveaux géniteurs (§ 2.2), et les résultats devraient se révéler acceptables (v. § 2.3.11 et 4.8) avant d'en utiliser les sujets.

On devrait fréquemment et assidûment observer les élevages (p. ex. journellement ou, au moins, trois fois par semaine, au cours de journées non consécutives), en notant le nombre d'adultes survivants, la production de jeunes dans chaque enceinte, les dates du renouvellement des élevages, le nombre de sujets transférés et leur classe d'âge, les repas journaliers, les mesures de la qualité de l'eau, etc. (v. section 7, « Rapports à produire »).

L'annexe C résume les conditions et modes opératoires de l'élevage d'*H. azteca* dans les laboratoires de l'État. Ces détails qui, on le présume, ont donné de bons résultats constituent des indications utiles, sauf mention du contraire. Le tableau 1 est une liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage de géniteurs d'*H. azteca*, dont la descendance servira aux essais de mesure de la toxicité des sédiments.

2.3.2 Installations et appareillage

On doit élever *H. azteca* en installation thermostatée de laboratoire. L'équipement servant à régler la température (incubateur, bain d'eau à recirculation ou enceinte thermostatée) doit la maintenir dans les limites exigées (§ 2.3.5). On doit isoler l'animalerie du local de préparation ou d'entreposage des échantillons ou du laboratoire afin d'éviter la contamination provenant de ces locaux. La conception et la construction de l'animalerie doivent prévenir la contamination des élevages (p. ex. absence de conduites ou des garnitures de cuivre ou de métal galvanisé d'où pourraient dégoutter des condensats contaminés par ces métaux). On devrait concevoir l'aération pour empêcher l'entrée ou la reprise d'air provenant du local des expériences ou de toute autre partie du laboratoire où des contaminants sont présents.

Tout l'équipement, tous les récipients et tous les accessoires risquant d'entrer en contact avec les organismes ou l'eau du local d'élevage (animalerie) doivent être propres, convenablement rincés et être construits de matériaux non toxiques (p. ex. verre, Téflon[MC], acier inoxydable de nuance 316, nylon, Nalgene[MC], porcelaine, polyéthylène, polypropylène, fibre de verre). Les matériaux toxiques (cuivre, zinc, laiton, métal galvanisé, plomb et caoutchouc naturel, notamment) ne doivent pas entrer en contact avec l'appareillage et l'équipement ni avec l'eau des élevages. On devrait filtrer au besoin l'air comprimé alimentant directement l'animalerie pour s'assurer qu'il est exempt d'huile et d'émanations.

Tableau 1. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage des *Hyalella azteca* destinés aux essais de mesure de la toxicité des sédiments[5]

Origine des amphipodes	—	Élevages commerciaux, laboratoires de l'État ou laboratoires privés ; tous les sujets utilisés dans un essai ont la même origine ; confirmation de l'espèce.
Acclimatation	—	Graduelle (≤ 2 °C/j) pour ce qui concerne les écarts de température à l'arrivée.
Origine de l'eau	—	Eau souterraine, eau de surface, eau reconstituée, non contaminée ou, au besoin, eau du robinet déchlorée ; eau de mer reconstituée ou naturelle d'une salinité ≤ 15 ‰, pour essais spéciaux.
Qualité de l'eau	—	Surveillance journalière de la température ; surveillance au moins hebdomadaire de l'OD ; mesure du pH, de la dureté, de l'alcalinité et de la teneur en ammoniaque pendant les 24 h précédant le début de l'essai.
Renouvellement de l'eau	—	Périodique ou continu ; il est recommandé d'ajouter au moins 1 volume/j (minimum : 25 à 30 % par semaine), à moins que l'eau ne soit recyclée par un système de filtration.
Température	—	23 ± 1 °C, moyenne journalière, et 23 ± 3 °C, mesure instantanée.
Aération / oxygénation	—	Aération modérée ; maintenir le taux d'OD à ≥ 80 % de la concentration de saturation.
Éclairage	—	500 à 1 000 lux immédiatement au-dessus de la surface de l'eau ; tubes (fluorescents ou l'équivalent) placés au-dessus de l'enceinte, débitant un large spectre de longueur d'ondes (spectre continu) ; photopériode de 16 h.
Substrat	—	Gaze ; autres choix autorisés (p. ex., v. annexe C.5).
Alimentation	—	On autorise divers types d'aliments, en quantités diverses et à des fréquences diverses.
Âge requis pour l'essai	—	De 2 à 9 j au début de l'essai.
Critères sanitaires	—	Écarter le lot d'organismes destinés à l'essai si plus de 20 % des jeunes meurent ou semblent stressés au cours des 48 h précédant l'essai.

5. Les conditions et modes opératoires ci-dessus s'appliquent principalement aux élevages d'âge connu (§ 2.3.10), ordinairement conservés dans des bechers ou des jarres de 1 à 2 L, pas nécessairement aux gros élevages de sujets d'âges mélangés.

2.3.3 Éclairage

Il devrait être vertical, en spectre continu (fluorescents ou l'équivalent). La photopériode devrait être fixée à 16 h. L'intensité lumineuse à proximité de la surface de l'eau des enceintes devrait varier de 500 à 1 000 lux (USEPA, 1994a).

2.3.4 Eau d'élevage

Qu'elle soit souterraine ou non, ou reconstituée, elle provient d'une source non contaminée. On peut également la préparer par dilution d'eau naturelle avec une eau distillée ou désionisée très pure, jusqu'à ce que l'on obtienne le degré de dureté recherché. Pour être acceptable, elle doit permettre une survie, une croissance et une reproduction satisfaisantes de l'espèce.

Dans certaines études localisées dans l'espace, le plan d'expérience pourrait exiger une eau prélevée au même endroit que les échantillons. Si on utilise cette eau ou une eau de surface, on devrait la passer au tamis fin (p. ex. à mailles de 30 µm) pour en éliminer les prédateurs ou les concurrents potentiels. On peut stériliser l'eau qui pourrait être infectée par des pathogènes, en la passant au stérilisateur aux ultraviolets.

On ne recommande pas l'eau déchlorée pour l'élevage ou les essais. Sa qualité est souvent variable, et les concentrations de chlore, de chloramines, de fluorures, de cuivre, de plomb, de zinc ou d'autres contaminants pourraient y être inacceptables. Toutefois, des laboratoires utilisent couramment à cette fin et sans problème apparent l'eau déchlorée du robinet. Si on utilise de l'eau potable du réseau municipal, la déchloration[6] doit, de fait, la débarrasser du chlore ou des chloramines[7] résiduels.

Si on élève *H. azteca* dans de l'eau douce reconstituée, on pourrait utiliser la recette du laboratoire de l'USEPA à Cincinnati (Ohio) [Smith *et al.*, 1992b]. La recette donnée ci-dessous, qui donne une eau d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ par litre provient d'USEPA (1994a). La proportion des chlorures aux sulfates y est plus grande que dans les autres recettes fréquemment utilisées (p. ex. USEPA, 1985a et b, 1991c, 1993 ; EC, 1992b). Dans certains laboratoires, la recette s'est révélée convenir à l'élevage d'*H. azteca*[8]. Afin de préparer 100 L d'eau douce reconstituée, utiliser des produits chimiques de qualité « réactif » (sels anhydres), comme suit (USEPA, 1994a) :

1. Verser environ 75 L d'eau désionisée très pure dans un récipient propre (v. § 3.1).
2. Ajouter 5 g de sulfate de calcium ($CaSO_4$) et 5 g de chlorure de calcium ($CaCl_2$) à une partie aliquote de 2 L d'eau

---

6. L'aération vigoureuse peut volatiliser une partie du chlore résiduel. Ensuite, la filtration sur charbon actif (charbon d'os), puis, peut-être, l'exposition aux UV (Armstrong et Scott, 1974) suppriment la plus grande partie des chloramines et des autres organochlorés résiduels. Le séjour de l'eau dans un bassin de garde aéré pendant 1 ou 2 j pourrait procurer un avantage supplémentaire.

7. La teneur visée en chlore résiduel, recommandée pour la protection des organismes dulcicoles, est d'au plus 0,002 mg/L (CCREM, 1987). Au-dessus, se pose le risque d'interaction entre la toxicité du chlore et des chloramines et celle du ou des contaminants qui font l'objet de l'essai. La limite de détection du chlore ou des chloramines résiduels dans l'eau déchlorée d'alimentation doit être suffisamment basse pour qu'on soit sûr que la teneur en chlore résiduel est d'au plus 0,002 mg/L.

8. N'ayant connu qu'un succès marginal dans l'élevage d'*H. azteca* en eau reconstituée, des laboratoires préfèrent l'eau naturelle de puits ou de surface (G.A. Burton fils, université d'État Wright, Dayton, Ohio, communication privée, 1994).

désionisée, puis mélanger (p. ex. au barreau magnétique) pendant 30 min ou jusqu'à dissolution des sels.

3. Ajouter 3 g de sulfate de magnésium ($MgSO_4$), 9,6 g de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) et 0,4 g de chlorure de potassium (KCl) à une deuxième partie aliquote de 2 L d'eau désionisée et mélanger au barreau magnétique pendant 30 min.

4. Verser les deux parties aliquotes de 2 L renfermant les sels en dissolution dans les 75 L d'eau désionisée et ajuster le volume de liquide dans la tourie à 100 L avec de l'eau désionisée.

5. Aérer le mélange au moins 24 h avant de l'utiliser.

6. La qualité de l'eau reconstituée devrait être approximativement comme suit : dureté de 90 à 100 mg/L exprimée en carbonate de calcium ($CaCO_3$) ; alcalinité de 50 à 70 mg/L en $CaCO_3$; conductivité de 330 à 360 µS/cm ; pH de 7,8 à 8,2.

On devrait aérer l'eau reconstituée avant de l'utiliser, afin de régler la concentration d'OD dans un intervalle acceptable (v. § 2.3.6) et d'en stabiliser le pH. On devrait mesurer la conductivité, le pH, la dureté, la teneur en OD et l'alcalinité de chaque lot d'eau reconstituée (USEPA, 1994a). L'USEPA (1991c) recommande d'utiliser le lot d'eau reconstituée deux semaines, mais pas plus de quatre.

L'eau de mer naturelle ou reconstituée d'une salinité de 15 ‰, au plus, peut servir à l'élevage d'*H. azteca* (USEPA, 1994a). On la reconstitue par ajout d'une saumure hypersalée, une préparation acceptable de sels de qualité « réactif » ou du sel marin sec du commerce (p. ex. Instant Ocean[MC]) à de l'eau désionisée ou distillée ou à une eau douce convenable, non contaminée, en quantité suffisante pour obtenir la salinité recherchée (EC, 1992a et 1997c ; USEPA, 1994b).

Le laboratoire devrait maintenir assez uniformes les caractéristiques de son eau d'élevage afin d'augmenter la probabilité de réussite et de réduire au minimum les variations des conditions de vie et de développement des organismes. Selon l'USEPA (1994a), la qualité de l'eau naturelle est considérée comme uniforme si la dureté, l'alcalinité et la conductance spécifique s'écartent, mensuellement, de moins de 10 % de leur moyenne et si, mensuellement, le pH varie de moins de 0,4.

On devrait enregistrer systématiquement la qualité de l'eau dans les enceintes d'élevage ; vérifier journellement la température et au moins hebdomadairement la teneur en OD ; mesurer, aussi souvent que c'est nécessaire pour déterminer la qualité de l'eau, sa dureté, son alcalinité, son pH et sa teneur en ammoniaque. On recommande la mesure au moins trimestrielle de ces variables de même que la veille d'un essai (USEPA, 1994a).

On devrait doser les nitrites, les matières en suspension (MES), les gaz totaux en dissolution, les métaux, les pesticides et tout autre contaminant préoccupant, aussi souvent que c'est nécessaire pour bien connaître la qualité de l'eau (p. ex. trimestriellement) d'élevage d'*H. azteca*. La limite de détection de chaque méthode d'analyse devrait être largement inférieure (c'est-à-dire de 3 à 10 fois) soit à la concentration dans l'eau, soit à la plus faible concentration qui s'est révélée nocive pour la survie, la croissance ou la reproduction d'*H. azteca* ou de tout autre animal dulcicole sensible (EC, 1992b).

On devrait renouveler systématiquement l'eau des enceintes d'élevage [9], manuellement ou automatiquement, grâce à l'appareillage et aux techniques convenables pour le renouvellement continu ou périodique de l'eau. L'USEPA (1994a) recommande un débit équivalent à au moins un volume par jour, bien qu'il semble inutile d'y aller à cette intensité. Le minimum admissible est de 25 à 30 % du volume par semaine (NWRI, 1992) à moins que l'eau ne soit recyclée au travers de filtres du commerce (fournitures d'aquariophiles).

2.3.5 Température

La température moyenne journalière de l'eau dans les enceintes d'élevage devrait être de 23 ± 1 °C (tableau 1), et la température instantanée devrait être de 23 ± 3 °C.

2.3.6 Oxygène dissous

On devrait aérer vigoureusement l'eau destinée à l'élevage immédiatement avant de l'employer, afin d'assurer une teneur en oxygène convenable et d'empêcher la sursaturation des gaz. On devrait alors doser l'OD afin de confirmer que sa teneur est satisfaisante (p. ex. 90 à 100 % de la teneur de saturation).

On devrait aérer modérément les élevages (p. ex. 1 bulle par seconde et par litre d'eau ; Brooke *et al.*, 1993) à l'air comprimé, exempt d'huile et filtré. On devrait distribuer l'air par des tubes jetables et des pipettes de verre ou de plastique à usage unique ou, dans les gros élevages, des pierres poreuses (fournitures d'aquariophiles). Pour s'assurer que l'OD est suffisant pour une la survie et la croissance optimales des amphipodes, il est recommandé de la maintenir à 80 à 100 % de la teneur de saturation.

2.3.7 Substrat

Différents substrats ont donné de bons résultats avec *H. azteca* (v. annexe C.5) ; nous on en laissons le choix à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire. On utilise souvent et nous recommandons la gaze, préalablement mise à tremper (p. ex. découpures de 5 cm × 10 ou 2,5 cm × 2,5, selon la taille de l'enceinte) [Borgmann *et al.*, 1989 ; DFO, 1992]. L'USEPA (1994a) recommande un trempage préalable de 24 h dans l'eau, puis son remplacement hebdomadaire. On peut également utiliser d'autres substrats, notamment la maille de nylon Nitex[MC], la maille de plastique ou des essuie-tout de papier déchirés (annexe C.5).

2.3.8 Alimentation

Dans l'élevage d'*H. azteca*, on a utilisé divers aliments et régimes alimentaires (v. annexe C.6). Un régime monoration, par exemple de flocons d'aliment du commerce pour poisson ou lapin (DFO, 1992 ; Ingersoll et Nelson, 1990 ; NWRI, 1992 ; Milani *et al.*, 1996), de même qu'un régime varié à base d'algues filamenteuses, de levure, de Cerophyll[MC] et de nourriture pour truite (USEPA, 1991b ; Brooke *et al.*, 1993) ont fonctionné. L'USEPA (1994a) recommande pour les amphipodes un mélange de levure, de Cerophyll[MC] et de nourriture pour truite (LCT) ainsi que de l'algue verte *Selenastrum capricornutum* et la diatomée *Navicula* spp., trois fois par semaine. On laisse le choix de l'aliment et du régime à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire.

2.3.9 Manipulation des organismes

Il faudrait manipuler le moins possible les amphipodes. Si cela est indispensable, y aller doucement, prudemment et rapidement afin de les stresser le moins possible. On peut

9. Les filtres d'aquarium du commerce peuvent assurer en continu une bonne qualité de l'eau (G.A. Burton fils, comm. privée, 1994 [*supra*]). Ils peuvent remplacer le système de renouvellement de l'eau ou servir en appoint.

transférer les adultes ou les jeunes d'un récipient à l'autre à l'aide d'une pipette de verre ou de plastique transparent à extrémité polie et à ouverture de 5 ou 6 mm de diamètre. On devrait relâcher les organismes ainsi transférés sous l'eau. On ne doit pas utiliser en vue des essais les sujets que l'on laisse tomber, que l'on blesse, qui entrent en contact avec des surfaces sèches ou qui semblent traumatisés.

2.3.10 Élevages d'âges mélangés et d'âge connu

Divers choix sont possibles concernant le type, la taille et la densité de peuplement des enceintes d'élevage (v. annexe C.2), l'eau et sa méthode de renouvellement (annexe C.3), le substrat (annexe C.5), la nourriture et la fréquence des repas durant l'élevage (annexe C.6), les techniques de capture des jeunes destinés aux essais (annexe C.7). Nous laissons le choix de ces paramètres à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire ; cependant, les méthodes d'élevage doivent produire suffisamment d'amphipodes de 2 à 9 j pour que l'on entreprenne les essais toxicologiques prévus avec le sédiment ou le(s) toxique(s) de référence. En outre, les organismes élevés doivent satisfaire à des critères précis de performance (v. § 2.3.11, 4.2 et 4.8).

Les laboratoires élevant *H. azteca* conservent souvent des élevages d'*âges mélangés* et d'*âge connu*. Nous recommandons cette pratique. Les élevages d'âges mélangés pourraient représenter un bassin populeux d'amphipodes d'âges mélangés, que l'on conserve dans au moins un aquarium (v. annexe C.2). Les élevages d'*âge connu* renferment des sujets d'une classe d'âge donnée (p. ex. de moins de 1 à 7 j ou de 7 à 14 j), qui ont été triés et qui sont conservés dans un certain nombre d'aquariums, de jarres et d'autres enceintes d'élevage (annexe C.2) jusqu'à ce qu'on les utilise dans les essais toxicologiques. Diverses méthodes permettent l'élevage de sujets d'âge connu (USEPA, 1994a). On peut utiliser celles qui donnent de bons résultats au personnel de laboratoire pour obtenir des organismes destinés aux expériences. Dans chacune de ces marches à suivre, on renouvelle systématiquement l'eau des enceintes et ainsi, on obtient des animaux d'âge connu.

Voici une méthode (Hamr *et al.*, 1994 ; Milani *et al.*, 1996) pour obtenir des *H. azteca* de moins de 1 à 7 j et les garder 2 j (c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils aient de 2 à 9 j) avant de les utiliser dans un essai de mesure de la toxicité d'un sédiment d'une durée de 14 j. Hamr *et al.* (1994) ont publié les motifs ainsi que les données expérimentales à l'appui du choix de cet intervalle d'âges et de cette durée. La méthode d'obtention de cette classe d'âge a été adaptée de Borgmann *et al.* (1989). Elle est recommandée comme l'une des diverses façons d'obtenir un nombre convenable d'organismes de 2 à 9 j (au moment où on les utilise pour mesurer la toxicité des sédiments).

On réunit environ 150 amphipodes adultes d'au moins 30 j, idéalement en amplexus (embrassement), dans des enceintes de 20 L renfermant chacune 15 L d'eau d'élevage et des découpures de gaze qu'on aura fait tremper 24 h dans l'eau. On peut utiliser la gaze jusqu'à trois semaines avant de la remplacer. Chaque jour, on distribue dans chaque enceinte une préparation de LCT (v. annexe G). Une fois par semaine, on sépare les amphipodes de la gaze et de l'eau en passant le contenu des enceintes au tamis à ouvertures de 500 et de 250 µm. On retourne les amphipodes retenus par le

premier tamis au enceintes, que l'on pourvoit de nouveau avec au moins 30 % d'eau fraîche et de nourriture. Les amphipodes retenus par le second tamis (250 µm) ont au plus 7 j. On les rince dans un bac de plastique translucide blanc disposé sur une table lumineuse et on les compte. À l'aide d'une pipette, on transfère alors les jeunes de chaque enceinte dans un becher de 1 L, qui renferme 750 mL d'eau d'élevage fraîche. Dans les bechers, la densité des amphipodes ne devrait pas excéder un sujet dans 10 mL d'eau d'élevage (c'est-à-dire 75 sujets par becher), pour ne pas inhiber leur croissance (K. Day, INRE, Burlington [Ont.], données non publiées). On devrait y placer de la gaze imbibée d'eau, qui servira de substrat aux amphipodes. Chaque jour, on donne à ces derniers 10 mL de LCT par becher, et on les garde 2 j avant d'entreprendre l'essai toxicologique. Les sujets ont donc de 2 à 9 j au début de l'essai. Chaque enceinte de 150 amphipodes donnera de 100 à 150 jeunes par semaine, en moyenne.

Il peut être souhaitable d'entreprendre un essai avec des sujets dont la différence des âges est moindre (p. ex. ± 1 j), plus particulièrement parce que la croissance sert de principal paramètre de mesure. L'USEPA (1994a) décrit une technique de séparation des amphipodes à maturité par un tamis n° 25 (à ouvertures de 710 µm), selon la méthode que nous venons de décrire : on garde ensuite le tamis pendant la nuit dans un bac de verre renfermant de l'eau d'élevage. On recueille les amphipodes nés après 24 h en soulevant et en abaissant le tamis plusieurs fois dans l'eau du bac de façon à y entraîner les bébés. On retire ensuite le tamis du bac et on retourne les adultes dans l'enceinte à sujets d'âges mélangés. On transfère à la pipette les jeunes qui ont traversé le tamis et on les loge dans une enceinte d'élevage, pour une période de croissance. On devrait compter les bébés afin de déterminer si on en a recueilli un nombre convenable pour l'essai. L'isolement d'environ 1 500 adultes (750 couples) en amplexus donne environ 800 jeunes en 24 h et exige environ six heures-personnes de travail.

On devrait conserver des dossiers sur le nombre d'adultes survivants, de couples reproducteurs et de jeunes produits ainsi que leur taux de survie. On devrait également conserver des dossiers sur l'âge des géniteurs et la fréquence de redémarrage des élevages. Ces renseignements permettent de construire des diagrammes des performances, qui aideront à déterminer si les élevages conservent un taux de reproduction vigoureux, signe de leur bonne santé. On peut s'attendre à un certain taux de mortalité des adultes dans les enceintes d'élevage, mais c'est d'un taux excessif qu'il faudrait s'inquiéter. L'altération de la qualité de l'eau ou de la nourriture ou la détérioration de l'état de santé des reproducteurs pourraient diminuer le taux de reproduction. La performance des élevages dépend de l'âge des adultes et elle peut suivre une évolution cyclique. Les femelles adultes continuent de se reproduire plusieurs mois ; toutefois, leur fertilité diminue graduellement après environ trois mois (USEPA, 1994a).

2.3.11 Critères de santé

On devrait vérifier l'état de santé des amphipodes en élevage trois fois par semaine (p. ex. le lundi, le mercredi, le vendredi) pour le moins, et, de préférence, journellement. Les sujets qui semblent morts ou qui sont inactifs lorsqu'on les pousse doucement ne doivent pas servir aux essais. Si plus de 20 % des amphipodes dans une enceinte d'élevage

d'*âge connu* semblent morts ou inactifs dans les 48 h précédant l'essai, il faut se débarrasser de tout le groupe présent dans le récipient (USEPA, 1994a).

Idéalement, un essai toxicologique de référence devrait coïncider avec chaque essai de mesure de la toxicité d'un sédiment. Les laboratoires utilisant systématiquement à cette fin *H. azteca* peuvent choisir de l'effectuer régulièrement, une fois par mois. Tous les essais effectués avec des toxiques de référence devraient avoir lieu dans les conditions et selon le mode opératoire exposés au § 4.8. Dans les § 4.2 et 4.8, nous énonçons les critères dont on se sert pour juger de la santé et de la sensibilité de l'élevage pour les besoins des essais.

Des mesures biochimiques, telles que la mesure du taux de lipides chez les amphipodes d'élevage ou le nombre moyen de jeunes produits par semaine par chaque adulte d'un élevage, pourraient donner des renseignements utiles sur la santé des élevages (USEPA, 1994a). Des notes écrites permanentes sur ces indices et d'autres de l'état de santé des élevages se révéleront sans doute utiles. Ne pas hésiter à en prendre. On n'a pas encore mis au point de critères sanitaires précis à l'égard des mesures physiologiques, bien que cela puisse se faire à l'avenir.

Système expérimental

3.1 Installations et appareillage

L'essai peut se dérouler dans un bain d'eau, un caisson climatique ou une enceinte équivalente, thermostatée et à éclairage programmé (v. § 3.2). L'installation expérimentale doit maintenir le sédiment et l'eau des enceintes à la température moyenne journalière de 23 ± 1 °C (v. § 4.2). Elle devrait être bien aérée afin de soustraire le personnel aux émanations nocives, être isolée des causes physiques de perturbation ou de tout contaminant nuisible aux organismes. Le local où on prépare les sédiments pour les essais devrait également être bien aéré.

L'installation expérimentale devrait être isolée du local d'élevage des amphipodes, afin d'éviter la contamination des élevages. En outre, elle ne devrait pas se trouver dans les locaux où on prépare les échantillons, afin de prévenir tout risque de contamination des enceintes et de leur contenu par ces sources. Le système de ventilation devrait être conçu, inspecté et utilisé de façon à empêcher l'air de l'installation expérimentale de contaminer les locaux d'élevage. L'air de reprise des locaux de manutention et d'entreposage des échantillons ou des locaux de traitement ou de contrôle des produits chimiques ne devrait pas retourner vers la partie du laboratoire servant aux essais. Tout matériau qui pourrait entrer en contact avec les organismes, l'eau ou les enceintes expérimentales de cette installation doit être non toxique (v. § 2.3.2).

L'air comprimé qui y sert à l'aération de l'eau doit être exempt d'huile et de vapeurs. Chaque fois que c'est possible, on devrait utiliser des pompes pneumatiques sans huile. Des filtres en circuit, que l'on remplace au besoin, afin d'en assurer l'efficacité, devraient arrêter toute l'huile ou toute particule présente dans l'air d'arrivée.

On devrait choisir l'équipement et les fournitures entrant en contact avec l'eau, les sédiments ou les enceintes expérimentales de façon à réduire au minimum la sorption de produits chimiques. On devrait utiliser, toutes les fois que c'est possible, le verre borosilicaté, le nylon, le polyéthylène haute densité, les polycarbonates, les plastiques fluorocarbonés et l'acier inoxydable 316 pour réduire au minimum la sorption et la lixiviation. On doit éviter les appareils et les fournitures faits de matériaux toxiques (v. § 2.3.2).

Au cours de l'essai, on peut soit renouveler l'eau journellement, soit fonctionner en conditions statiques (v. section 4). Plusieurs modèles d'appareils assurent la distribution et le renouvellement de l'eau surnageante dans les enceintes [10](p. ex. Maki, 1977 ; Benoit *et al.*, 1993 ; Zumwalt *et al.*, 1994). Conviendrait un appareil qui permet le renouvellement minuté et intermittent de l'eau dans chaque enceinte, au débit de deux additions du volume par jour (USEPA, 1994a). Nous recommandons le dispositif automatisé conçu par Zumwalt *et al.* (1994),

10. On peut également remplacer l'eau surnageante manuellement, par siphonnement, ce qui demande plus de main-d'œuvre et remet généralement en suspension plus de sédiments qu'un système automatisé (USEPA, 1994a).

parce qu'il est peu coûteux, qu'il est facile à construire et à étalonner et qu'il débite des volumes d'eau petits et assez constants vers les enceintes. L'USEPA (1994a) donne des conseils utiles sur la conception de ce système et d'autres systèmes automatisés (au débit de deux fois le volume par jour).

Que l'on opte pour les conditions statiques ou pour le renouvellement journalier de l'eau exigeant l'aération de l'eau (v. § 4.3), on a besoin, pour l'aération continue (à faible débit) de chaque enceinte, d'un jeu de pipettes de verre jetables et de tubes d'aération pour aquariums. Pour régulariser le débit de l'air, nous recommandons des robinets multiples en acier inoxydable (plutôt qu'en laiton). En conditions statiques (y compris dans les essais avec un toxique de référence), il faut un approvisionnement de verres de montre de la bonne taille pour couvrir chaque enceinte expérimentale.

L'installation expérimentale doit être dotée des instruments de base exigés pour surveiller la qualité (p. ex. température, pH, OD, conductivité) de l'eau d'essai et de l'eau de porosité. En outre, le laboratoire devrait être équipé des instruments qui facilitent l'analyse rapide et fidèle, dans les limites acceptables de détection, des variables telles que la dureté, l'alcalinité, la teneur en ammoniaque et (si on utilise pour l'élevage ou les expériences l'eau déchlorée de la ville) le chlore résiduel.

Dans toutes les enceintes, l'équipement et les fournitures qui peuvent entrer en contact avec les sédiments ou l'eau doivent être propres et rincés, avant usage, à l'eau d'essai, à l'eau désionisée ou à l'eau distillée. On devrait laver après usage toutes les fournitures non jetables. On recommande la méthode suivante de nettoyage (USEPA, 1994a).

1. Trempage à l'eau du robinet, 15 min ; récurage au détergent ou lavage au lave-vaisselle automatique.
2. Double rinçage à l'eau du robinet.
3. Rinçage soigneux à l'acide nitrique (HNO_3) ou chlorhydrique (HCl) frais, dilué (10 % en volume [11]) afin d'éliminer le tartre, les métaux et les bases.
4. Double rinçage à l'eau désionisée.
5. Rinçage à l'acétone non diluée, de pureté convenant à l'analyse des pesticides, afin de supprimer les composés organiques (travailler sous hotte ouverte ou fermée).
6. Triple rinçage à l'eau désionisée de qualité.

On devrait rincer à fond, avec l'eau d'essai, immédiatement avant de les utiliser dans l'essai, les enceintes expérimentales et l'appareillage susceptibles d'entrer en contact avec les sédiments ou l'eau d'essai.

Avant d'entreprendre des essais toxicologiques dans une nouvelle installation expérimentale, on devrait réaliser au moins cinq essais toxicologiques de référence d'une durée de 96 h, *sur de l'eau seulement*, et au moins cinq essais de mesure *de la survie et de la croissance*, d'une durée de 14 j, dans un sédiment témoin, afin de confirmer les performances acceptables d'*H. azteca* dans la nouvelle installation et dans les conditions d'élevage et d'essai que nous énonçons (v. § 2.3.1 et section 4). Dans chaque essai avec toxique de référence ou sédiment témoin, on devrait employer un lot différent d'organismes obtenus par élevage. On devrait comparer les résultats de ces essais

11. Pour préparer la solution d'acide à 10 %, ajouter précautionneusement 10 mL d'acide concentré à 90 mL d'eau désionisée.

préliminaires en calculant et en estimant le coefficient de variation des séries respectives d'essais et des paramètres de mesure.

3.2 Éclairage

L'éclairage de toutes les enceintes devrait être direct et vertical, en spectre continu (p. ex. éclairage fluorescent ou l'équivalent), et être assez intense pour fournir de 500 à 1 000 lux près de la surface de l'eau. L'éclairage devrait être aussi uniforme que possible dans toutes les enceintes. On devrait régler la photopériode à 16 h.

3.3 Enceintes expérimentales

On recommande des bechers ou des jarres de verre de forme haute, de 300 mL de contenance et d'un diamètre intérieur d'environ 7 cm (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a ; EC, 1997a). Il faut nettoyer à fond avant et après usage chaque becher ou jarre (§ 3.1) et bien la rincer, avant usage, à l'eau d'essai. Normalement, les essais avec renouvellement journalier de l'eau n'exigent pas de couvrir les enceintes, contrairement aux essais en conditions statiques. On recommande de les couvrir cependant si le sédiment renferme des concentrations décelables de gaz volatils. Font de bons couvercles les verres de montre propres ou les couvercles de verre ou de plastique.

3.4 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution

Selon ce que sera le plan d'expérience et l'objectif de l'essai (v. sections 5 et 6), on peut prendre comme eau d'essai (c'est-à-dire l'eau recouvrant les sédiments) et comme eau témoin ou de dilution (c'est-à-dire l'eau servant à préparer les solutions filles et l'eau témoin des essais *avec eau seulement* et toxiques de référence) l'eau d'une source non contaminée d'eau douce ou estuarienne naturelle ou de l'eau reconstituée. Souvent, c'est l'eau qui a servi à l'élevage d'*H. azteca* (v. § 2.3.4), mais elle peut être différente. Par exemple, l'eau trouvée sur place ou de l'eau propre dont on a réglé la dureté à la valeur de celle de l'eau qui se trouve sur les lieux du prélèvement peuvent se révéler un bon choix (v. § 5.4). La qualité de l'eau servant aux expériences et de l'eau témoin ou de dilution est extrêmement importante ; cette eau doit s'être révélée permettre une survie et une croissance acceptables des organismes au cours d'essais d'une durée de 14 j menée avec un sédiment témoin (v. § 4.2) avant de servir aux essais toxicologiques. Dans le § 2.3.4, on trouvera des conseils sur la préparation d'eau douce ou d'eau estuarienne reconstituée (salinité ≤ 15 ‰).

Il faut régler l'eau d'essai ainsi que l'eau de contrôle et de dilution à la température des enceintes (23 ± 1 °C) avant usage. Le taux d'OD dans l'eau devrait être de 90 à 100 % de la valeur à la saturation, à cette température. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume exigé d'eau (à l'air comprimé, exempt d'huile, traversant des pierres poreuses) immédiatement avant usage et on devrait vérifier la teneur en OD afin de confirmer que ce gaz se situe à 90 à 100 % de la teneur de saturation. On ne devrait utiliser l'eau que si son pH est stable.

3.5 Sédiment témoin

Chaque essai de mesure de la toxicité des sédiments doit comprendre un témoin expérimental, constitué d'au moins cinq bechers ou jarres renfermant du même sédiment témoin, essentiellement exempt de tout contaminant qui pourrait nuire à la

survie, à la croissance ou au comportement d'*H. azteca* au cours de l'essai. Ce sédiment témoin mesure le caractère acceptable de l'essai (la survie moyenne à la fin doit être d'au moins 80 %), il montre que les organismes sont en bonne santé et se comportent normalement et il sert de point de comparaison à l'interprétation des résultats obtenus sur les sédiments d'essai.

Le sédiment témoin peut être soit un sédiment naturel prélevé dans la nature, mais à l'écart de sources connues de contaminants, qui s'est déjà révélé autoriser une survie et une croissance acceptables d'*H. azteca* dans les conditions expérimentales, soit un sédiment artificiel[12].

Le choix du bon sédiment témoin dépend de considérations telles que le plan d'expérience, les caractéristiques physico-chimiques du ou des sédiments d'essai et la disponibilité d'un sédiment convenable, non contaminé, possédant les propriétés recherchées. Le sédiment devrait également s'être révélé donner des valeurs acceptables et cohérentes aux paramètres biologiques de mesure, au moyen d'*H. azteca* et de la présente méthode. Si les sédiments naturels non contaminés ont longtemps servi comme sédiments témoins dans des essais toxicologiques avec *H. azteca*, les sédiments artificiels sont un gage d'une constance et d'une uniformité plus grandes, que recherchent de nombreux scientifiques (Smith *et al.*, 1992b ; Dwyer *et al.*, 1993 ; Suedel et Rodgers, 1994a et b ; USEPA, 1994a ; Suedel *et al.*, 1996). Il est actuellement prématuré de recommander une recette de sédiment artificiel qui convienne à un essai de mesure *de la survie et de la croissance* en 14 j à l'aide d'*H. azteca*.

---

12. On dit également *sédiment reconstitué* ou *sédiment synthétique*. On le prépare ordinairement à base de sable, de limon, d'argile et de constituants organiques non toxiques du commerce. On le mouille avec de l'eau reconstituée ou naturelle. On peut imiter différents sédiments naturels quant à la granulométrie, à la teneur en carbone organique, au pH, à la capacité d'échange cationique, etc. (Suedel et Rodgers, 1994b ; Milani *et al.*, 1996). On peut également utiliser au moins une recette pour préparer un ou des sédiments témoins normalisés, que l'on utilisera systématiquement dans le dosage biologique de la toxicité des sédiments d'eau douce au moyen d'*H. azteca* ou d'autres espèces de l'endofaune (Suedel *et al.*, 1996).

Modes opératoires universels

Les méthodes et les conditions générales exposées dans les pages qui suivent s'appliquent à chacun des essais toxicologiques décrits pour les échantillons de sédiment, de déchets particulaires et de produits chimiques ainsi qu'aux essais toxicologiques de référence. Dans la section 5, nous exposons des méthodes plus spécifiques pour les essais mettant en jeu des échantillons de sédiments ou d'autres matières particulaires semblables (p. ex. boues, stériles miniers essorés, résidus de boues de forage) prélevés sur le terrain. Dans la section 6, nous donnons des orientations et des méthodes particulières pour la réalisation d'essais utilisant des échantillons témoins ou des échantillons enrichis expérimentalement à l'aide d'un ou de plusieurs produits chimiques, sédiments contaminés ou déchets particulaires.

Il faut intégrer dans les modes opératoires universels tous les aspects du système expérimental décrits dans la section 3. La liste sommaire de contrôle des conditions expérimentales et des modes opératoires recommandés du tableau 2 ne décrit pas seulement des modes opératoires universels, mais, également, des modes opératoires permettant de tester des types précis de substances ou de matières.

Tableau 2. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour la mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'*Hyalella azteca*

Essai universel

Type d'essai	— Mesure de la toxicité du sédiment entier, en 14 j. Deux options : renouvellement journalier de l'eau surnageante ; pas de renouvellement (essai en conditions statiques)
Renouvellement de l'eau	— Si journalier, à raison de deux volumes par jour ; si en conditions statiques, aucun renouvellement durant l'essai, sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation.
Eau (surnageante) d'essai	— Eau d'élevage, eau souterraine ou eau de surface non contaminée ; eau du lieu de prélèvement ; eau dont la dureté a été réglée à celle de l'eau du lieu de prélèvement ; eau douce reconstituée, pour une plus grande uniformisation ; eau de mer naturelle ou reconstituée, de salinité d'au plus 15 ‰, pour les essais utilisant des sédiments estuariens ; OD à 90 à 100 % de la valeur à saturation dans l'eau surnageante.

Essai universel

Sédiment témoin	— Échantillon de sédiment non contaminé, utilisé pour évaluer les performances des organismes et l'acceptabilité de l'essai ; sédiment naturel ou artificiel.
Amphipodes	— Prélevés dans un élevage d'âge connu, à moins de 1 j à 7 j, puis gardés dans 750 mL d'eau d'élevage dans un becher de 1 L, pendant 2 j avant l'essai, en étant nourris journellement avec 10 mL de LCT ; au début de l'essai, ils ont de 2 à 9 j ; 10 amphipodes par enceinte expérimentale.
Enceinte expérimentale	— Becher ou jarre de verre de forme haute, de 300 mL ; diamètre intérieur d'environ 7 cm ; normalement non couvert, si on renouvelle journellement l'eau ; couvert en conditions statiques.
Volume de sédiment humide	— 100 mL.
Volume de l'eau d'essai	— 175 mL.
Nombre de répétitions	— Recommandé : au moins 5 du terrain, chacune constituée d'un échantillon discret (c'est-à-dire différent) provenant du même emplacement d'échantillonnage ; obligatoire : au moins 5 répétitions en laboratoire pour chaque répétition provenant du terrain.
Température	— Moyenne journalière, 23 ± 1 °C ; température instantanée, 23 ± 3 °C.
Éclairage	— Éclairage vertical en spectre continu (par fluorescents ou l'équivalent) ; 500 à 1 000 lux ; photopériode de 16 h.
Aération	— Aucune, si renouvellement journalier de l'eau, à moins que la teneur en OD dans l'eau surnageante ne chute sous 40 % de la valeur de saturation ; en conditions statiques, aération continue et minimale (p. ex. 2 à 3 bulles/s, dans chaque enceinte expérimentale.
Alimentation	— Suspension aqueuse de LCT, distribuée journellement (1,5 mL [environ 2,7 mg de nourriture solide, poids sec] chaque jour dans chaque enceinte), ou trois fois par semaine, en des journées non consécutives (3,5 mL [environ 6,3 mg, poids sec] dans chaque enceinte).
Observations	— Facultatifs : le nombre d'amphipodes dans chaque enceinte aperçus sur le sédiment, et leur comportement (observation journalière ou moins fréquente).
Mesures des caractéristiques de l'eau surnageante	— Au moins trois fois par semaine : la teneur en OD et la température dans chaque enceinte ; au début et à la fin de l'essai : le pH, la conductivité et la teneur en ammoniaque, dans chaque enceinte ; recommandées : la dureté et/ou l'alcalinité, au début et à la fin.

Essai universel

Paramètres de mesure	— Survie et poids notablement inférieurs à ceux des organismes témoins et des enceintes de référence (d'après le pourcentage moyen de survie et poids sec moyen, dans chaque enceinte ; CL50 après 14 j d'exposition à une série de concentrations, s'il y a lieu ; CIp pour le gain de poids, s'il y a lieu.
Validité de l'essai	— Essai invalide si le taux de survie, après 14 j, des amphipodes exposés au sédiment témoin est inférieur à 80 % ; invalide si le poids sec moyen par amphipode dans les groupes témoins des répétitions est inférieur, à la fin de l'essai, à 0,1 mg.

Sédiment (ou matière particulaire semblable) prélevé sur le terrain

Transport et entreposage	— Si l'échantillon se trouve à plus de 7 °C, refroidir à cette dernière température (glace ou contenants réfrigérants) ; transport à l'obscurité, ente 1 et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C) ; conservation à l'obscurité à 4 ± 2 °C ; l'essai devrait débuter dans les deux semaines et le doit dans les six semaines.
Sédiment de référence	— Au moins un échantillon pour les essais effectués avec un sédiment prélevé sur le terrain ; l'échantillon de référence est prélevé en des endroits présumés non pollués, mais dans les parages des lieux de prélèvement des sédiments d'essai (c'est-à-dire même étendue d'eau) ; souvent retenu pour l'essai toxicologique en raison de ses similitudes physico-chimiques (p. ex. granulométrie et/ou teneur en carbone organique) avec les sédiments d'essai.
Caractérisation de l'échantillon	— Au moins le pourcentage de sable, de limon et d'argile, de carbone organique total, le pourcentage d'eau, le pH de l'eau de porosité et la teneur en ammoniaque de l'eau de porosité.
Préparation de l'échantillon	— Uniquement s'il le faut, enlever les débris et les macro-organismes indigènes à l'aide de pincettes ; homogénéiser l'échantillon (y compris tout liquide surnageant) avant de l'utiliser dans l'essai ; au besoin, le débarrasser des petits macro-organismes, par passage au tamis fin (p. ex. 0,25 à 0,5 mm) par pression mécanique ou par lavage au liquide qui s'est séparé de l'échantillon au cours du transport et de l'entreposage, puis mêler de nouveau ce liquide avec l'échantillon tamisé.

Échantillon enrichi

Caractérisation de l'ajout ou des ajouts	— Information exigée sur la stabilité, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la pureté et la biodégradabilité des substances chimiques ajoutées au sédiment témoin.

Échantillon enrichi

Solvant	— L'eau d'essai est le solvant à préférer ; si on utilise un solvant organique, l'essai doit comprendre un témoin du solvant.
Préparation des mélanges	— Le mode opératoire dépend du plan et des objectifs de l'expérience ; il pourrait comprendre une ou plusieurs concentrations de produit(s) chimique(s) mélangé(s) dans le sédiment témoin ou le sédiment d'essai ou des concentrations d'un produit donné ajouté à l'eau d'essai recouvrant le sédiment témoin ; on peut préparer les mélanges de produits chimiques et de sédiment sous forme de suspension, soit à la main, soit par agitation mécanique.
Concentration de l'ajout ou des ajouts	— Normalement mesurée au début et à la fin de l'essai, en trois titres : élevé, moyen et faible.
Eau d'essai et de dilution	— Utiliser de l'eau reconstituée si on exige un degré poussé d'uniformité.

Nous décrivons les modes opératoires universels de l'essai de mesure de la toxicité des sédiments, d'une durée de 14 j[13], qui comprend les deux options suivantes[14] :

(1) renouvellement journalier de l'eau surnageante au rythme de deux volumes par

13. Avec *H. azteca*, on a souvent effectué des essais toxicologiques pouvant durer quatre semaines (p. ex. Nebeker *et al.*, 1984 ; Borgmann et Munawar, 1989 ; Borgmann et Norwood, 1993 ; Ingersoll et Nelson, 1990 ; ASTM, 1991a et 1993 ; NWRI , 1992). Après 14 j, on pourrait mieux discerner les effets toxiques sur la survie des amphipodes, mais la sensibilité de la croissance, comme paramètre de mesure, pourrait ne pas être meilleure, en raison de la maturation et du dimorphisme sexuels qui se manifestent alors (Borgmann *et al.*, 1989). Le mode opératoire que nous décrivons, modifié au besoin ou non, permettrait aussi, au-delà de quatre semaines, de discerner et de mesurer les effets sur la reproduction d'*H. azteca* (Borgmann *et al.*, 1989 ; ASTM, 1991a et 1993).

14. Les deux options ont donné des résultats en apparence semblables, quand on les a utilisées selon les modes opératoires que nous exposons. On a comparé la performance des deux options à l'aide d'essais parallèles et d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou enrichis de contaminant (Milani *et al.*, 1996). Les essais interlaboratoires avec *H. azteca* ont montré que la précision et la sensibilité des deux systèmes étaient semblables (Milani *et al.*, 1996). Les coefficients de variation (CV) interlaboratoires de la moyenne générale (de tous les laboratoires) des données sur le taux de survie après 14 j de chacun des quatre échantillons de sédiment prélevés sur le terrain variaient de 3,6 à 19,6 %, en conditions statiques et de 2,5 à 11,0 % dans le système à renouvellement périodique. Dans les deux systèmes, la croissance a été plus variable, les CV du poids sec des amphipodes à la fin de l'essai variant de 28,4 à 48,8 % en conditions statiques et de 26,0 à 35,7 %, dans le système à renouvellement périodique.

Dans chaque laboratoire, l'ajout d'une gamme de concentrations de cuivre aux sédiments révèle une tendance vers des CL50 (données sur la survie) et des CI25 (données sur la croissance) inférieures quand l'essai se déroule en conditions statiques, bien que ces écarts (dénotant une plus grande sensibilité de l'essai en conditions statiques) n'aient été significatifs que pour deux des quatre laboratoires ayant effectué des essais parallèles de chaque option (Milani *et al.*, 1996).

jour, normalement sans aération ;
(2) conditions statiques, où l'eau surnageante n'est pas renouvelée, mais est aérée. Quelle que soit l'option, on nourrit les amphipodes avec une suspension aqueuse de LCT, soit journellement (1,5 mL [environ 2,7 mg de nourriture, poids sec]), soit trois fois par semaine, en des journées non consécutives, (3,5 mL [environ 6,3 mg, poids sec]). Les paramètres biologiques de mesure sont la survie et le poids sec à la fin de l'essai.

4.1 Début de l'essai

Chaque enceinte (v. § 3.3) de l'installation expérimentale doit être clairement codée ou étiquetée afin de reconnaître l'échantillon ou sa concentration. Il faut enregistrer la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes ou sur des feuilles séparées, portant exclusivement sur l'essai. On devrait disposer les enceintes de façon à faciliter les observations et les mesures. Les variantes devraient être réparties au hasard dans l'installation expérimentale (USEPA, 1994a).

La journée de la première exposition des amphipodes aux échantillons de matière ou de substance d'essai est désignée jour 0. La veille (c'est-à-dire le jour -1), on devrait mélanger à fond [15] (v. § 5.3 et 6.2) chaque échantillon ou sous-échantillon de sédiment ou de matière particulaire d'essai, y compris de sédiment témoin et de sédiment de référence, jusqu'à homogénéisation de la couleur, de la texture et de la teneur en eau. Le contrôle quantitatif de l'homogénéité pourrait porter sur la répartition granulométrique, le carbone organique total, le taux d'humidité et comprendre le dosage de certaines molécules.

Immédiatement après le mélange, on devrait transvaser dans les enceintes des sous-échantillons de 100 mL de l'échantillon. Il faut établir au moins cinq répétitions (enceintes) [16] de laboratoire par variante de l'essai (v. § 5.1 et 6.2). On devrait lisser le sédiment versé dans chaque enceinte à la spatule ou en frappant doucement la paroi du tranchant de la main. On verse ensuite l'eau d'essai (v. § 3.4) doucement le long de la paroi du becher ou de la jarre. Afin de perturber le moins possible le sédiment, on peut appliquer à sa surface, avant de verser l'eau, un disque de Téflon[MC], de polyéthylène ou de nylon, découpé aux dimensions intérieures du becher (EC, 1992a) [17]. Si, au cours de l'essai, on renouvelle journellement l'eau surnageante, on devrait ajouter alors dans l'enceinte 175 mL d'eau d'essai (ou de solution d'essai, selon la nature de l'essai) en tout ; on peut se faire une idée du volume ajouté, par une marque indiquant 275 mL sur la paroi. En vue des essais en conditions statiques, on peut d'abord ajouter un volume quelque peu moindre (p. ex. 125 à 145 mL), pour disposer d'un certain volume de réserve pour l'addition d'eau au moment où on ajoutera les organismes.

---

15. On doit remêler à l'échantillon tout liquide qui s'en est séparé pendant le transport ou l'entreposage.

16. L'USEPA (1994a) exige au moins quatre répétitions par variante et en recommande huit par variante pour les essais toxicologiques utilisant un sédiment entier.

17. En y attachant une longueur suffisante de monofilament de nylon (ou d'un matériau équivalent non toxique), on facilite ensuite la récupération du disque. On peut aussi découper le disque dans un sac de polyéthylène, en lui donnant la forme d'un « trou de serrure ». La « patte » attachée au cercle permet sa récupération. On devrait rincer le disque avec de l'eau d'essai, si on le réutilise dans les répétitions d'une variante. Pour chaque variante, on devrait utiliser un disque distinct.

Si on renouvelle journellement l'eau surnageante de chaque enceinte, on devrait le faire la veille (jour – 1) de l'essai, puis tout au long de l'essai, à raison de deux volumes par jour (USEPA, 1994a ; tableau 2) [18], en évitant un débit supérieur afin de prévenir l'entraînement et la baisse de concentration inutiles des contaminants du sédiment par leur lixiviation dans l'eau surnageante. Cette dernière n'est normalement pas aérée, et on couvre les enceintes. On recommande d'employer un dispositif automatisé de renouvellement intermittent, comme celui de Benoit *et al.* (1993) modifié par Zumwalt *et al.* (1994) [v. § 3.1] ; on peut le régler pour renouveler l'eau surnageante à intervalle de 12 h. Si on utilise un système automatisé, on devrait l'étalonner avant l'essai, afin d'en vérifier le comportement ; entre deux enceintes, le débit ne devrait jamais différer de plus de 10 % au cours de l'essai (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a). Si on renouvelle l'eau surnageante deux fois par jour par siphonnement, on devrait veiller à ne pas perturber le sédiment ou à ne pas perdre accidentellement d'amphipodes sortis du sédiment au cours de l'opération. On ne devrait pas siphonner et remplacer plus de 90 % de l'eau, et l'extrémité du tube ne doit pas toucher le sédiment.

Si l'essai se passe en conditions statiques, il faudrait aérer l'eau de chaque enceinte durant la nuit avant d'y introduire les organismes et poursuivre l'aération durant l'essai (v. § 4.3). On devrait couvrir chaque becher ou jarre (d'un verre de montre ou d'un couvercle de plastique) avant et durant l'essai, afin de réduire au minimum l'évaporation de l'eau et le risque de contamination. On devrait remplacer au jour 7 de l'essai (ou plus souvent, si on le veut ou si c'est nécessaire) toute eau perdue par évaporation, en ajoutant doucement de l'eau d'essai, qu'on laissera couler le long de la paroi de l'enceinte. On aura réglé la température de cette eau. Sur la paroi, une marque indiquant 275 mL pourra aider à évaluer le volume à ajouter.

Les organismes d'essai ont de 2 à 9 j au jour 0 (v. § 2.3). Souvent, mais pas obligatoirement, l'eau d'élevage servira à recouvrir les sédiments au cours de l'essai. En raison de ses objectifs, un essai donné peut exiger de l'eau d'une autre origine (p. ex. l'eau de l'endroit à l'étude). Si, pour l'essai, on se sert d'une autre eau que l'eau d'élevage, il n'est pas nécessaire d'y acclimater les organismes (USEPA, 1994a), bien que cela puisse être à conseiller, afin de réduire au minimum le stress causé par une eau aux caractéristiques différentes. S'il faut acclimater les organismes, il est utile de les garder 2 h dans un mélange 50/50 d'eau d'élevage et d'eau d'essai, puis 2 h dans un mélange 25/75, enfin 2 h dans une eau 0/100,

---

18. Dans les essais avec renouvellement (jusqu'à quatre par jour) de l'eau surnageante, les caractéristiques de la qualité de l'eau restent généralement semblables à celles de l'eau fournie. Toutefois, en l'absence de mesure de la toxicité des sédiments dans les essais sans renouvellement ou avec moins d'un renouvellement par jour, la qualité (p. ex. conductivité, alcalinité, dureté) peut varier fortement. Ainsi, la valeur de ces trois paramètres ou la teneur en produits du métabolisme (p. ex. l'ammoniaque) pourraient augmenter (Ingersoll et Nelson, 1990 ; Ankley *et al.*, 1993a ; USEPA, 1994a), en étant susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai. On peut éviter ces variations par le renouvellement systématique (c'est-à-dire deux fois par jour) de l'eau surnageante tout au long de l'essai. En dépit de cela, certains chercheurs préfèrent les essais en conditions statiques, moins exigents en main-d'œuvre et en équipement, de crainte que le renouvellement journalier (ou deux fois par jour) de l'eau ne détoxifie graduellement le sédiment et n'en atténue les effets toxiques potentiels (Milani *et al.*, 1996).

avant de les introduire dans les enceintes expérimentales (Ingersoll et Nelson, 1990). Cette acclimatation devrait se faire au jour – 1.

Si on a l'intention d'utiliser un sédiment estuarien, il est recommandé d'acclimater graduellement, au préalable, les organismes à une eau estuarienne de salinité semblable à celle de l'eau de porosité du sédiment d'essai. On pourrait aussi inclure dans l'étude des témoins supplémentaires, en utilisant un sédiment témoin dont l'eau de porosité possède une salinité semblable à celle du sédiment d'essai.

Au jour 0, on répartit au hasard 10 amphipodes par enceinte. On devrait les manipuler le moins possible et le plus précautionneusement possible (v. § 2.3.9) au cours du transfert (§ 2.3.10). Il faut les déposer dans l'eau. On peut les transférer directement, à la pipette, de leur enceinte d'élevage à l'eau surnageante (Ankley *et al.*, 1993a). On peut également compter 10 amphipodes en les transvasant dans une enceinte de transfert (p. ex. un gobelet de plastique de 30 mL) remplie de l'eau d'essai à la température d'essai également, puis on les recompte avant de les transférer dans l'eau surnageante (Ingersoll et Nelson, 1990 ; USEPA, 1994a). Cette dernière façon de faire est particulièrement utile, puisqu'elle permet de compter deux fois les organismes avant de les transférer dans l'enceinte expérimentale. Après le transfert, on devrait augmenter au besoin le volume de l'eau surnageante jusqu'à la marque de 275 mL inscrite sur la paroi de l'enceinte.

4.2 Conditions expérimentales

- L'essai mesure la toxicité d'un sédiment complet. Selon le cas : (1) on ne renouvelle pas l'eau surnageante sauf ajout périodique (p. ex. au jour 7) du volume nécessaire d'eau d'essai pour compenser les pertes dues à l'évaporation (c'est-à-dire essai en conditions statiques) ; (2) on renouvelle l'eau surnageante tout au long de l'essai, à raison de deux volumes par jour (essai avec renouvellement journalier de l'eau).
- L'essai dure normalement 14 j[19].
- Il doit se dérouler à la température moyenne journalière (de l'eau surnageante) de 23 ± 1 °C. En outre, la température instantanée doit se trouver dans l'intervalle de 23 ± 3 °C (USEPA, 1994a ; ASTM, 1995a).
- Le récipient recommandé pour l'essai est un becher ou une jarre de verre de forme haute de 300 mL, dont le diamètre intérieur est d'environ 7 cm.
- Les sédiments témoins et d'essai doivent former une couche uniforme de 100 mL, recouverte de 175 mL d'eau.
- Si on renouvelle journellement l'eau, on ne couvre normalement pas les enceintes, mais on peut utiliser des couvercles pour réduire au minimum la perte de substances volatiles des sédiments ou pour réduire le risque de contamination. On n'aère normalement pas l'eau surnageante, à moins que la teneur en OD ne chute sous 40 % de la valeur de saturation au cours de l'essai (v. § 4.3). Dans chaque enceinte, on doit nourrir les amphipodes, soit trois fois par semaine (en des journées non consécutives), soit journellement (v. § 4.4).
- En conditions statiques, on devrait couvrir les enceintes. On devrait aérer

19. Voir la note 13.

continuellement l'eau surnageante à un débit minimal (v. § 4.3). On doit nourrir les organismes, soit trois fois par semaine, soit journellement (v. § 4.4).

- Les enceintes bénéficient d'une photopériode de 16 h, fournie par un éclairage vertical, en spectre continu (fluorescents ou l'équivalent) . L'intensité de la lumière près de la surface de l'eau devrait être de 500 à 1 000 lux.
- Pour que l'essai soit valide, le taux moyen de survie des amphipodes dans le sédiment témoin doit être d'au moins 80 % à la fin de l'essai. En outre, le poids sec minimal de chaque amphipode dans les groupes témoins des répétitions doit être en moyenne d'au moins 0,1 mg à la fin de l'essai (jour 14)[20].

4.3 Oxygène dissous et aération

H. azteca peut tolérer l'hypoxie (§ 1.4). Quand on renouvelle journellement l'eau surnageante, il est habituellement inutile d'aérer cette dernière. En effet, la concentration d'OD n'y descendra pas sous 40 % de la concentration de saturation, grâce au renouvellement, à moins que le sédiment utilisé n'exerce une demande exceptionnelle en oxygène. Si, au cours de l'essai avec renouvellement journalier de l'eau, le taux d'OD descend sous 40 % ou excède 100 % du taux de saturation dans au moins une des enceintes, on devrait aérer l'eau surnageante de toutes les enceintes, y compris des enceintes témoins afin de maintenir la concentration d'OD entre 40 et 100 % de saturation. Si on doit aérer l'eau surnageante, on devrait distribuer dans chaque enceinte de l'air comprimé exempt d'huile, au moyen d'une conduite et d'un tube de plastique ou de verre jetables (p. ex. tube capillaire ou pipette munie d'un cône Eppendorf) à petite ouverture (p. ex. 0,5 mm, d.i.). Pour la régularisation du débit de l'air, il est utile de disposer de robinets multiples en acier inoxydable. L'extrémité du tube d'où sort l'air devrait être suspendue à environ 3 cm au-dessus du sédiment. L'aération de chaque enceinte doit être lente (p. ex. 2 à 3 bulles/s) et elle ne devrait pas perturber la surface du sédiment (Zumwalt *et al.*, 1994). Il faut signaler dans les rapports ou procès-verbaux de l'expérience toute opération d'aération du milieu faite durant l'essai (section 7).

En conditions statiques, on devrait aérer en continu l'eau surnageante de chaque enceinte, à compter de la nuit précédant le début de l'essai (v. § 4.1) de même que durant l'essai. L'air comprimé, déjà filtré de façon à être exempt d'huile, devrait barboter en passant par une pipette de verre jetable. L'extrémité de la pipette devrait être suspendue à environ 3 cm au-dessus du sédiment. L'aération de chaque enceinte doit être lente (p. ex. 2 à 3 bulles/s). On devrait vérifier systématiquement le débit de l'air vers chaque enceinte (p. ex. journellement) durant l'essai et effectuer les réglages nécessaires pour qu'il reste lent.

4.4 Nourriture et alimentation

Quelle que soit l'option retenue pour l'essai, on doit nourrir les organismes, soit une fois

20. D'après les données sur le poids sec de groupes témoins d'*H. azteca*, après 14 j d'exposition à des conditions statiques ou au renouvellement intermittent de l'eau (selon nos définitions), Milani *et al.* (1996) concluent que le critère de validité d'au moins 0,1 mg par organisme serait normalement réaliste et sensible à l'égard de cet amphipode. C'est pourquoi ils recommandent ce critère, quelle que soit l'option retenue.

par jour, soit trois fois par semaine (en des journées non consécutives). Comme le poids sec des amphipodes est un paramètre important de mesure, il faut distribuer dans chaque enceinte, à chaque repas, une ration identique. Cette ration doit permettre une croissance acceptable d'*H. azteca* durant l'essai (v. § 4.2), sans être trop généreuse [21].

Si on choisit de nourrir les amphipodes journellement, il faut, à compter du jour 0 distribuer dans chaque enceinte 1,5 mL (ce qui équivaut à environ 2,7 mg d'aliment, poids sec) d'un mélange de LCT [22] jusqu'à la fin de l'essai. Si on choisit trois repas par semaine, il faut ajouter, à compter du jour 0 jusqu'à la fin de l'essai, en des journées non consécutives (p. ex. le lundi, le mercredi et le vendredi), 3,5 mL de LCT (ce qui équivaut à environ 6,3 mg de nourriture, poids sec). Les deux rations procurent la même quantité globale de nourriture, c'est-à-dire 10,5 mL de LCT (environ 18,9 mg d'aliment sec) par semaine et par enceinte. Le repas quotidien est préférable parce qu'il permet de répartir également la nourriture disponible, bien que trois repas par semaine puissent être le choix retenu afin de réduire au minimum le travail de fin de semaine (Milani *et al.*, 1996) [23].

À chaque repas, on devrait prendre des notes détaillées sur le type d'aliment et la ration distribuée dans chaque enceinte. On devrait noter également l'aspect du sédiment en surface (c'est-à-dire les signes d'une croissance bactérienne ou fongique). Si, dans au moins une enceinte recevant une nourriture quotidienne, la concentration d'OD chute sous 40 % de saturation, il faudrait suspendre temporairement l'alimentation dans toutes les enceintes, le temps qu'il faudra pour que la teneur en oxygène revienne dans la fourchette acceptable (USEPA, 1994a).

4.5 Observations et mesures au cours de l'essai

Si, ayant choisi de renouveler journellement l'eau, on utilise un système automatisé (v. § 3.1 et 4.1), il faudrait en contrôler le

---

21. L'alimentation est essentielle pour assurer un taux de survie convenable (d'au moins 80 %) et de croissance acceptable aux organismes (Ankley *et al.*, 1993a et 1994 ; Milani *et al.*, 1996). Il faut éviter une nourriture trop généreuse ou hétéroclite, ce qui pourrait modifier la biodisponibilité des contaminants du sédiment ou favoriser la croissance de champignons microscopiques ou de bactéries à sa surface (USEPA, 1994a).

22. Ce type d'aliment et de ration s'est révélé convenir à *H. azteca* dans les conditions définies d'expérience (Ankley *et al.*, 1993a et 1994 ; Milani *et al.*, 1996), et la ration journalière répond aux recommandations de l'USEPA (1994a) et de l'ASTM (1995a) pour la détermination de la toxicité d'un sédiment à l'aide cet amphipode. D'autres aliments et rations, notamment les régimes monoration pour lapin (Ingersoll et Nelson, 1990 ; ASTM, 1991a et 1993), les flocons pour poisson (Borgmann *et al.*, 1989 ; NWRI , 1992) du commerce ou les régimes multirations, par exemple à base d'algues et de luzerne plus des flocons pour poisson (Herrin *et al.*, 1992), se sont révélés propices à un taux de survie convenable (d'au moins 80 %) et à un taux de croissance acceptable chez les animaux témoins, dans les conditions et le mode opératoire précisés pour l'essai. Toutefois, il n'est pas recommandé d'employer d'autre aliment ou ration que ceux nous précisons (c'est-à-dire LCT, journellement, à raison de 1,5 mL par enceinte et par repas ou trois fois par semaine à raison de 3,5 mL par enceinte et par repas), de crainte de modifier la biodisponibilité des contaminants et de nuire à l'uniformité des conditions de l'expérience.

V. l'annexe H pour la préparation du LCT.

23. Des expériences parallèles, d'une durée de 14 j, sous les deux régimes, ont montré que la survie et la croissance (poids sec à la fin de l'essai) d'*H. azteca* ne diffèrent pas significativement d'un régime à l'autre (Milani *et al.*, 1996).

fonctionnement chaque jour. Tout problème de réglage du débit ou tout débordement des enceintes en raison de l'obturation des crépines des conduites d'évacuation devrait entraîner une intervention immédiate (nettoyage, etc.).

Selon les objectifs qu'on s'est donnés, il peut valoir la peine de vérifier régulièrement chaque enceinte (de préférence chaque jour) pour observer et enregistrer le nombre d'amphipodes que l'on voit nager dans l'eau ou flotter à sa surface ou se tenir ou se nourrir à la surface du sédiment [24]. On devrait doucement pousser tout animal flottant à la surface de l'eau vers le fond, à l'aide d'une tige ou d'une pipette de verre.

Il faut mesurer la température de l'eau surnageante au début de l'essai et, par la suite, au moins trois fois par semaine, au cours de journées non consécutives (p. ex. le lundi, le mercredi, le vendredi) jusqu'à la fin de l'essai. Ces mesures doivent se faire dans au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'expérience ; nous recommandons une fréquence plus grande (c'est-à-dire journalière). En outre, nous recommandons d'enregistrer en continu la température d'un bain d'eau quelconque et/ou la température de l'air dans une pièce ou une enceinte d'essai à température contrôlée.

On doit mesurer au début de l'essai et, par la suite, au moins trois fois par semaine, au cours de journées non consécutives (p. ex. le lundi, le mercredi et le vendredi), jusqu'à la fin de l'essai, la concentration d'OD dans l'eau surnageante d'au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'expérience. Des mesures plus fréquentes (p. ex. journalières ; ASTM, 1995a), qui seraient justifiées pour les sédiments exerçant une forte demande en oxygène, pourraient être indiquées. On recommande d'employer alors une sonde et un oxymètre étalonné pour le dosage de l'OD. La sonde doit être examinée soigneusement après chaque lecture, pour s'assurer qu'aucun organisme n'y adhère, et il faut la rincer à l'eau désionisée ou distillée avant de la plonger dans un autre échantillon, afin de réduire au minimum le risque de contamination croisée. Si les enceintes sont aérées au cours de l'essai (§ 4.3), il faudrait vérifier fréquemment et systématiquement la position de l'extrémité de la pipette dans chaque enceinte et le débit de l'aération, puis effectuer les corrections nécessaires.

Il faut mesurer, au début et à la fin de l'essai, la conductivité et le pH et doser l'ammoniaque dans au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'essai. En outre, on devrait mesurer la dureté et/ou l'alcalinité dans l'eau surnageante, au début et à la fin de l'essai, dans au moins une enceinte représentative de chaque variante de l'essai (USEPA, 1994a). Pour chaque concentration d'ammoniaque (v. APHA *et al.*, 1995), il faudrait calculer celle de l'ammoniac non ionisé, en tenant compte des valeurs concomitantes du pH et de la température de l'eau surnageante (Trussell, 1972 ; USEPA, 1985c).

On peut mesurer la conductivité et le pH à l'aide de sondes et d'appareils étalonnés. On peut doser l'ammoniaque au moyen d'une électrode spécifique à l'ion ou par prélèvement d'une partie aliquote de l'eau surnageante, pour l'analyser. On doit faire

---

24. Le nombre d'amphipodes sortis du sédiment peut aider à évaluer le comportement d'évitement. Pour nous, ces observations ne valent pas nécessairement la peine, puisque *H. azteca* est un amphipode épibentique qui sort souvent des sédiments propres.

comme avec la sonde à OD : soigneusement examiner la sonde immédiatement après chaque lecture et la rincer à l'eau désionisée avant de la plonger dans une autre enceinte. Pour les mesures de la dureté et de l'alcalinité et pour le dosage de l'ammoniaque, qui exigent des parties aliquotes d'échantillon d'eau surnageante, on devrait prélever l'échantillon immédiatement avant l'introduction des organismes et à la fin de l'essai. Il pourrait être nécessaire de réunir les échantillons d'eau de chaque répétition de l'essai. Pour ces mesures, on ne devrait pas prélever plus de 10 % du volume de l'eau surnageante d'une enceinte (c'est-à-dire pas plus de 17,5 mL). On devrait utiliser une pipette, pour prélever soigneusement l'eau à la profondeur de 1 à 2 cm au-dessus du sédiment. On devrait vérifier la pipette pour s'assurer qu'on n'a aspiré aucun amphipode au cours du prélèvement.

Les déterminations de la qualité de l'eau, au début et à la fin de chaque variante d'un essai, sont utiles, puisqu'elles donnent une indication de l'influence du sédiment sur la qualité de l'eau qui le recouvre. Si, dans une variante, on constate une variation marquée (p. ex. de plus de 50 % ; USEPA, 1994a) d'au moins un paramètre de qualité, entre les mesures initiale et finale, on recommande de vérifier les conditions qui ont existé au cours de l'essai et le mode opératoire utilisé (p. ex. le rythme de renouvellement de l'eau surnageante, si l'essai comportait cette opération journalière) et d'examiner soigneusement les caractéristiques physico-chimiques du sédiment utilisé.

4.6 Fin de l'essai

L'essai prend fin après 14 j. Immédiatement avant de tamiser le contenu de l'enceinte, on devrait, à l'aide d'une pipette, en récupérer tous les amphipodes vivants ou apparemment morts qui se trouvent dans l'eau ou à la surface du sédiment. On devrait garder les animaux complètement inactifs, sans, de toute évidence, être morts (p. ex. ils ne sont pas en état de décomposition) dans une boîte de Petri ou un récipient convenable, rempli d'eau d'essai. On doit les examiner de près, sous microscope de faible puissance ou à la loupe. On devrait les pousser doucement du bout d'une pointe fine pour confirmer l'absence de signe de vie (par exemple la contraction des pléopodes) et les compter pour morts.

On devrait noter le nombre de morts et de survivants. On devrait jeter les cadavres et déposer tous les vivants dans une nacelle numérotée ou tout autre petit récipient permettant de les garder. Le récipient devrait renfermer assez d'eau d'essai, pour rincer les amphipodes et les garder un peu de temps jusqu'à l'arrivée des survivants récupérés par tamisage du sédiment de l'enceinte, qu'on rincera dans la même eau.

Le tamisage puis l'examen du contenu de chaque enceinte pour en récupérer les organismes vivants ou morts devraient prendre le même temps d'une enceinte à l'autre. Pour s'assurer que l'on s'y prend de la bonne façon, nous recommandons que les préposés au tamisage aient montré leur capacité de retrouver dans le sédiment au moins 90 % d'*H. azteca* de taille semblable [25].

---

25. L'USEPA (1994a) recommande de vérifier la capacité de retrouver les organismes par la méthode de Tomasovic *et al.* (1995) : on ajoute les organismes au sédiment témoin et on en détermine la récupération après une heure à l'aide de la technique de tamisage du contenu des enceintes à la fin de l'essai.

Nous recommandons la technique suivante, tirée d'USEPA (1994a), pour tamiser le contenu de chaque enceinte. On peut se servir d'autres techniques ou de tamis d'un maillage différents, à la condition que, lors d'essais préliminaires, ils se soient révélés permettre la récupération des organismes[26].

(1) Passer la moitié de l'eau surnageante au tamis n° 50 (à mailles de 300 µm) U.S. Standard.

(2) Faire tourbillonner ce qui reste d'eau pour mettre en suspension le centimètre supérieur de sédiment. Faire passer la suspension au tamis n° 50. À l'aide d'eau d'essai, entraîner le refus du tamis dans un bassin ou un bac blanc d'inspection.

(3) À l'aide d'une pissette remplie d'eau d'essai, rincer les grosses particules de sédiment subsistant dans l'enceinte en leur faisant traverser un tamis n° 40 (à mailles de 425 µm) et, avec la même eau, entraîner le refus du tamis dans un deuxième bac ou bassin d'inspection.

On compte tous les animaux vivants récupérés de l'eau surnageante ou du sédiment de l'enceinte expérimentale, puis on les réunit dans une nacelle à peser numérotée ou un petit récipient semblable et on les rince à l'eau d'essai afin de déloger tout sédiment adhérant aux carapaces. Le rinçage devrait être bref et ne pas survenir plus de 10 min après l'introduction du premier amphipode.

Après le rinçage, on devrait transférer les amphipodes survivants dans une nacelle propre d'aluminium, qui aura été numérotée, tarée et gardée au dessiccateur[27].

On porte les nacelles à l'étuve et on laisse sécher 24 h à 60 °C (NWRI, 1992). Chaque nacelle renferme les amphipodes survivants d'une enceinte (répétition). Au sortir de l'étuve, on porte sans tarder les nacelles au dessiccateur. Après refroidissement, on devrait choisir une nacelle au hasard et la peser immédiatement[28], à la dizaine de microgrammes près, sur une balance fidèle jusqu'à cette limite de pesée. On calcule pour chaque groupe la masse sèche moyenne de chaque amphipode survivant[29] (v. § 4.7).

---

26. On peut remplacer le tamisage par la méthode suivante : réunir le sédiment dans l'angle d'une cuvette peu profonde, au fond translucide, reposant sur une table lumineuse ; incliner la cuvette et, par lavage au moyen d'une pissette remplie d'eau d'essai, entraîner les particules de sédiment vers le bas, afin d'exposer et de compter les amphipodes (U. Borgmann, Pêches et Océans Canada, INRE, Burlington (Ontario), communication privée, 1994).

27. Conseil : faire sécher les nacelles à l'étuve, au moins 48 h, jusqu'à poids constant, puisque les dépôts cireux associés aux nacelles pourraient provoquer des erreurs de pesée (G. Ankley, USEPA, Duluth (MN), communication privée, 1994).

28. Les amphipodes séchés pouvant absorber rapidement la vapeur d'eau, la pesée de chaque nacelle doit être rapide et d'une durée uniforme. En même temps, des précautions sont nécessaires, parce qu'on risque de perdre des spécimens, en raison de la précipitation des gestes et de l'électricité statique.

29. La longueur du corps de chaque amphipode survivant à la fin de l'essai a été un autre moyen de mesurer la croissance au bout d'essais de détermination de la toxicité d'un sédiment à l'aide d'*H. azteca* (v. annexe D.9). L'USEPA (1994a) accepte les déterminations fondées soit sur le poids sec, soit sur la longueur du corps comme paramètres de la croissance. Nous recommandons de se fier au poids sec. La longueur du corps possède un avantage sur le poids sec : on peut préserver les spécimens pour des analyses ultérieures (USEPA, 1994a), et les résultats individuels peuvent servir à l'analyse de variance à plusieurs critères de classification et à l'évaluation de la maturation sexuelle (Kemble *et al.*, 1994). Dans la méthode que nous présentons, on pourra utiliser la longueur du corps plutôt que le poids sec à la condition que des études montrent sans l'ombre d'un doute que c'est un indicateur pour le

Au cours de ces manipulations, on devrait reporter au dessiccateur la première nacelle pesée, pour la repeser à la fin des pesées ; on vérifie ainsi le gain d'eau des autres nacelles qui se trouvaient au dessiccateur. Le gain de poids ne devrait pas excéder 5 %, sinon il faudrait faire sécher de nouveau toutes les nacelles pendant au moins 2 h, puis les repeser. On devrait tarer quelques nacelles, les faire sécher et les peser à vide. Les résultats devraient se conformer aux normes de maîtrise de la qualité du laboratoire.

4.7 Paramètres de mesure et calculs

Les paramètres de mesure biologiques de cet essai de détermination de la toxicité des sédiments d'une durée de 14 j sont la survie et le poids sec moyen. On évalue la réduction de la survie ou le ralentissement de la croissance par comparaison avec des groupes témoins et/ou de référence. On retient, comme indication définitive de la toxicité, le plus sensible de ces deux effets.

À la fin des 14 j d'exposition, on note sur chaque répétition, y compris les groupes témoins, le nombre d'amphipodes vivants et le nombre de morts. Pour chaque variante, il faut calculer les deux paramètres suivants :

- Le pourcentage moyen (± un écart-type) d'amphipodes ayant survécu.
- Le poids sec moyen (± un écart-type) par amphipode survivant, d'après le poids total du groupe de survivants.

On suppose que les amphipodes manquants sont morts et qu'ils se sont désintégrés au cours de l'essai. Ils entrent dans le bilan des morts de chaque répétition. On mesure ensuite le poids sec total du groupe de survivants de la répétition.

L'essai est invalide si le taux moyen de survie des amphipodes exposés 14 j au sédiment témoin est de moins de 80 %. Il est également invalide si le poids sec moyen des groupes témoins de la répétition est inférieur à 0,1 mg par amphipode à la fin de l'essai.

On peut utiliser diverses méthodes statistiques pour évaluer les résultats de l'essai. Les possibilités, les motifs de choix et les méthodes de calcul sont l'objet d'une discussion en profondeur dans des rapports de l'USEPA (1989, 1994a, b et c) et d'Environnement Canada (1997d). Le choix du traitement statistique dépend de l'essai et du plan d'expérience et, notamment, de l'emploi de sous-échantillons de sédiment ou de concentrations multiples de substance(s) ou de matière(s) d'essai. Les sections 5 et 6 donnent des indications sur les paramètres de mesure et les calculs statistiques.

4.8 Essais avec toxique(s) de référence

Il faut utiliser systématiquement un toxique ou des toxiques de référence pour évaluer, dans des conditions normalisées, la sensibilité relative de l'élevage ou des élevages d'*H. azteca* ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire. Le plus souvent, on effectue concurremment avec l'essai de mesure de la toxicité d'un sédiment par *la survie et la*

---

moins aussi sensible de la croissance. Nous nous appuyons sur Becker *et al.* (1995). Dans l'essai de mesure de la survie et de la croissance de têtes-de-boule, d'Environnement Canada (EC, 1992c), on déduit la croissance du seul poids sec, sans utiliser la longueur comme critère d'effet, parce que l'augmentation de la masse et de l'épaisseur du corps d'individus sains n'entraîne pas toujours un allongement proportionnel du corps pendant l'essai. Un phénomène semblable pourrait toucher *H. azteca* dans l'essai que nous décrivons.

croissance d'*H. azteca* (v. annexe E) des essais *avec de l'eau seulement* et un ou plusieurs toxiques de référence. Il existe et on continue de mettre au point des méthodes d'enrichissement des sédiments ou des méthodes toxicologiques de référence employant un *sédiment enrichi* (Burton, 1991 ; Smith *et al.*, 1992b ; Suedel *et al.*, 1993a et b ; EC, 1995). Elles devraient se répandre. Nous recommandons, pour utilisation courante, un essai de référence d'une durée de 96 h, en conditions statiques, *dans l'eau seulement*, avec les essais de mesure de la toxicité des sédiments effectués avec *H. azteca*, pratique suivie par l'USEPA (1994a). On peut compléter cet essai de référence ou le remplacer par au moins un essai employant un ou des *sédiments enrichis* d'un ou de plusieurs toxiques de référence, après normalisation des modes opératoires convenables. À cet égard, on devrait consulter le guide d'Environnement Canada sur l'emploi d'un sédiment témoin enrichi d'un toxique de référence (EC, 1995).

Le tableau 3 est une liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais toxicologiques de référence *dans l'eau seulement*, d'une durée de 96 h, en conditions statiques, employant *H. azteca*. Le mode opératoire recommandé, qui a de nombreux points communs avec la méthode de l'USEPA (1994a), utilise des amphipodes de 2 à 9 j au début de l'essai (10 par enceinte expérimentale) et au moins cinq concentrations plus un témoin (c'est-à-dire utilisant uniquement de l'eau témoin ou de l'eau de dilution) et au moins une répétition par variante. Les enceintes recommandées sont des bechers ou des jarres de verre de forme haute, d'une capacité de 300 mL et d'un diamètre intérieur d'environ 7 cm ; le volume recommandé de solution pour l'essai est de 200 mL par enceinte. Au cours de l'essai, on n'aère pas les solutions, et les enceintes sont normalement couvertes, pour réduire au minimum la contamination et les pertes dues à l'évaporation. Il est recommandé de distribuer 0,5 mL de LCT (ou d'un aliment équivalent ; v. § 4.4) dans chaque enceinte (y compris celles des témoins) aux jours 0 et 2 de l'essai.

Pour cet essai, la température et l'éclairage sont les mêmes que ceux que l'on a décrits pour la mesure définitive de la toxicité des sédiments (v. § 4.2 et tableaux 2 et 3). On observe chaque jour le nombre de cadavres ou de moribonds dans chaque enceinte. Pour chaque variante de l'expérience, on mesure : chaque jour, la température et la teneur en OD ; au début et à la fin de l'expérience, le pH, l'alcalinité, la dureté et la conductivité de l'eau (§ 4.5). Les paramètres de mesure de l'essai sont le taux moyen de survie correspondant à chaque variante de l'expérience et la CL50 après 96 h. Il faut déclarer invalide l'essai toxicologique de référence si le taux moyen de survie dans l'eau témoin est inférieur à 90 % à la fin de l'essai (tableau 3).

Des critères appropriés de sélection de toxiques convenables de référence pourraient être les suivants (EC, 1990 et 1995) :

- le produit pur est facilement disponible ;
- il est chimiquement stable (longue durée de conservation) ;
- on peut le répartir également dans tout le substrat non pollué ;
- avec l'organisme d'essai, la relation entre la dose et la réaction est bonne ;
- le produit est stable en solution aqueuse ;
- il est peu dangereux pour l'utilisateur ;

- il est facile de le doser avec précision ;
- on connaît l'influence de la qualité de l'eau (p. ex. pH, dureté) sur la toxicité de la substance pour l'organisme d'essai ;
- on connaît l'influence des caractéristiques physico-chimiques du sédiment (p. ex. granulométrie, teneur en carbone organique) sur la toxicité de la substance pour l'organisme d'essai.

Il est recommandé d'employer avec *H. azteca* le sulfate de cuivre, le chlorure de cadmium, le chlorure de potassium ou le chlorure de sodium de qualité réactif comme toxiques de référence (USEPA, 1994a). Il faut réaliser chaque mois un essai toxicologique de référence à l'aide d'élevages établis d'*H. azteca* du laboratoire et d'au moins l'un de ces toxiques (USEPA, 1994a). On devrait également évaluer le comportement de tout élevage que l'on vient d'établir dans le laboratoire avec de nouveaux géniteurs, en utilisant le ou les toxiques de référence, avant de les utiliser à la production d'organismes d'essai (v. § 2.3.1 et 2.3.11).

Les rapports utiles d'Environnement Canada donnent des indications sur la sélection, la réalisation et l'utilisation d'essais toxicologiques de référence *dans l'eau seulement* (EC, 1990) ou avec un *sédiment enrichi* (EC, 1995). Il est conseillé au personnel de laboratoire peu au fait de ces essais de les consulter au préalable.

Il incombe au laboratoire de prouver qu'il peut obtenir des résultats constants et précis avec un ou des toxiques de référence, avant de passer aux dosages biologiques définitifs de la toxicité d'un sédiment au moyen d'*H. azteca*. À cette fin, le personnel devrait d'abord déterminer la reproductibilité intralaboratoire de ses mesures, exprimée par un coefficient de variation, en effectuant au moins cinq essais avec le(s) toxique(s) de référence et différents groupes d'*H. azteca*, d'élevages séparés et d'âges connus (§ 2.3.10) du laboratoire (USEPA, 1994a).

Tableau 3. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais toxicologiques de référence dans *l'eau seulement* avec *Hyalella azteca*

Type d'essai	— Essai de la mesure de toxicité dans *l'eau seulement*, d'une durée de 96 heures, en conditions statiques.
Toxique de référence	— Sulfate de cuivre ($CuSO_4$), chlorure de cadmium ($CdCl_2$), chlorure de potassium (KCl) ou chlorure de sodium (NaCl).
Fréquence de l'essai	— Une fois par mois, en même temps que l'essai ou les essais définitifs sur des échantillons de sédiment.
Solutions d'essai	— Une solution témoin et au moins cinq concentrations d'essai.
Renouvellement des solutions	— Aucun.
Eau témoin et eau de dilution	— Eau d'élevage ou n'importe quelle eau souterraine ou de surface non polluée ; eau douce reconstituée, si on recherche un haut degré d'uniformité ; eau de mer naturelle ou reconstituée d'une salinité d'au plus 15 ‰ pour les essais employant un sédiment estuarien ; teneur en OD de 90 à 100 % de la valeur de saturation lorsque utilisé dans l'essai.

Amphipodes	— Prélevés dans un élevage dont on connaît l'âge des sujets, alors qu'ils ont moins de 1 j jusqu'à 7 j ; conservés et nourris dans un becher pendant 2 j avant l'essai ; ils ont de 2 à 9 j au début de l'essai ; on en met 10 par enceinte expérimentale.
Substrat pour les amphipodes	— Une découpure de 2,5 cm sur 2,5 de gaze médicale, préalablement imbibée d'eau d'élevage pendant 24 h ; ou découpure de 2,5 cm sur 2,5 de Nitex[MC] ou d'un maillage de plastique.
Enceinte expérimentale	— Becher ou jarre de verre de forme haute, de 300 mL, d'environ 7 cm de diamètre intérieur ; normalement couverte.
Volume de solution d'essai	— 200 mL.
Nombre de répétitions	— Au moins une.
Température	— Journalière moyenne : 23 ± 1 °C ; instantanée : 23 ± 3 °C.
Éclairage	— Éclairage vertical, en spectre continu (fluorescents ou l'équivalent) ; 500 à 1 000 lux ; photopériode de 16 h.
Aération	— Aucune.
Alimentation	— LCT, 0,5 mL dans chaque enceinte, aux jours 0 et 2.
Observations	— Journalières, dans chaque enceinte, du nombre de cadavres et de moribonds.
Mesures de la qualité de l'eau	— Pour chaque variante de l'expérience : mesures journalières de l'OD et de la température ; au début et à la fin de l'essai, mesures du pH, de l'alcalinité, de la dureté et de la conductivité.
Paramètres de mesure	— Taux moyen de survie, dans chaque variante de l'expérience ; CL50 après 96 h.
Validité de l'essai	— L'essai est considéré comme invalide si le taux moyen de survie après 96 h dans l'eau témoin est inférieur à 90 %.

Pour ces essais préliminaires, il devrait utiliser le ou les mêmes toxiques de référence, les mêmes concentrations, la même eau (de même origine) et le même mode opératoire (c'est-à-dire, tableau 3). Les essais systématiques mensuels avec le ou les toxiques de référence devraient toujours suivre ce même mode opératoire. On devrait choisir une série de concentrations[30] auxquelles, d'après les essais préliminaires, correspondront un taux partiel de mortalité pour au moins deux de leurs valeurs et qui permettront de calculer la CL50 après 96 h avec un intervalle de confiance dont l'étroitesse est acceptable (v. § 6.5).

Dès qu'on dispose de suffisamment de données (EC, 1990 et 1995), on doit porter sur une carte de contrôle les CL50 d'un toxique donné de référence, dans l'ordre de leur observation, et déterminer si les résultats se situent à ± 2 écarts-types des résultats d'essais antérieurs avec *H. azteca*, le même toxique et le même mode opératoire. Pour chaque toxique de référence qu'on utilise, on doit construire et actualiser une carte de contrôle. Sur l'axe vertical se trouverait le

30. V. l'annexe H pour des indications sur la gamme convenable de concentrations à sélectionner. Chaque concentration devrait être au moins la moitié de celle qui la précède.

logarithme de la concentration ; sur l'axe horizontal, la date ou le numéro de l'essai. On devrait comparer chaque nouvelle CL50 du toxique de référence aux limites établies sur ce graphique ; la CL50 est acceptable si elle est à l'intérieur de la zone de confiance.

Dans tous les calculs de la moyenne et de l'écart-type et sur tous les graphiques, on devrait utiliser le logarithme de la concentration (y compris de la CL50). C'est simplement une question d'adhérer à l'hypothèse selon laquelle on a estimé chaque CL50 d'après le logarithme des concentrations. On peut construire la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne ± 2 écarts-types sur du papier graphique ordinaire, en convertissant ces valeurs en valeurs arithmétiques et en portant ces dernières sur l'échelle logarithmique de papier semi-logarithmique. Si les CL50 se révèlent ne pas obéir à la loi log-normale, une moyenne et un écart-type arithmétiques pourraient mieux convenir.

On devrait recalculer, à l'obtention de chaque CL50 successive du toxique de référence, la moyenne des valeurs connues de log *CL50* ainsi que les limites de la zone de confiance (± 2 σ), tant que les statistiques ne se stabiliseront pas (EC, 1990, 1995, 1997d). Si une valeur donnée de la CL50 se retrouve à l'extérieur de ces limites, on soupçonne la sensibilité des organismes d'essai ainsi que la réalisation et la précision de l'essai. Comme le phénomène pourrait survenir 5 % du temps par le seul jeu du hasard, une CL50 aberrante n'est pas nécessairement le signe d'une culture à la sensibilité anormale ou d'une précision insatisfaisante des données toxicologiques. Ce serait plutôt un avertissement. La vérification en profondeur de toutes les conditions et de toutes les méthodes d'élevage et d'essai serait indiquée. Selon ce qu'on découvrira, il pourrait falloir répéter l'essai toxicologique de référence, obtenir de nouveaux géniteurs ou établir de nouveaux élevages d'*âge connu*, avant d'entreprendre d'autres essais de mesure de la toxicité des sédiments.

Des résultats qui restent dans la zone de confiance ils ne faut pas déduire que le laboratoire obtient des résultats constants. Des données extrêmement variables sur un toxique de référence élargissent la zone de confiance. Une nouvelle donnée pourrait s'y retrouver en représentant un écart indésirable pour les résultats de l'essai. Environnement Canada (1990) propose comme limite raisonnable un coefficient de variation de pas plus de 30 %, de préférence 20 % ou moins.

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sédiment (ou de matières particulaires semblables) prélevé sur le terrain

La présente section renferme des instructions particulières sur la préparation d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou de matières particulaires semblables et sur la mesure de leur toxicité. Ces instructions s'ajoutent aux modes opératoires exposés dans la section 4. Au cours des essais portant sur ces échantillons, on devrait soit renouveler journellement l'eau surnageante, soit fonctionner en conditions statiques (v. section 4), selon les objectifs ou les contraintes de chaque essai ou les lignes directrices ou les exigences réglementaires connexes.

Des instructions détaillées sur le prélèvement, la manutention, le transport, l'entreposage et l'analyse des sédiments prélevés sur le terrain se trouvent dans ASTM (1991b et 1995b) et Environnement Canada (1994). On devrait consulter ce dernier rapport sur ces questions et s'y conformer (en sus du présent document), pour le prélèvement et la préparation d'échantillons de sédiment sur le terrain en vue des essais toxicologiques avec *H. azteca*.

5.1 Prélèvement de l'échantillon

Environnement Canada (1994) présente une synthèse utile du plan d'échantillonnage sur le terrain et des techniques convenant au prélèvement des échantillons. Les études toxicologiques des sédiments naturels par des essais biologiques employant *H. azteca* ou d'autres organismes convenables inféodés aux sédiments font souvent partie d'études plus vastes, qui pourraient englober : une batterie d'essais toxicologiques visant à évaluer la toxicité du sédiment entier, de l'eau de porosité ou de l'élutriat ; des mesures de la bioaccumulation des contaminants ; des dosages chimiques ; des relevés des organismes de l'épifaune ou de l'endofaune et, peut-être, la collecte de données géologiques et hydrographiques. On peut améliorer la corrélation statistique et réduire les coûts en prélevant simultanément les échantillons destinés à ces essais, à ces analyses et à ces corpus.

Systématiquement et régulièrement (p. ex. trimestre, semestre ou année), on pourrait prélever, dans un certain nombre d'endroits, des échantillons de sédiment destinés à l'évaluation d'un effet négatif sur la survie et la croissance d'*H. azteca*, dans un dessein de surveillance et d'application de la loi, ou en prélever en une ou en plusieurs occasions pour établir les limites spatiales (c'est-à-dire horizontales et verticales) ou temporelles de la qualité des sédiments. On pourrait visiter un ou plusieurs endroits pour y prélever un sédiment de référence (que l'on peut supposer être non contaminé) au cours de chaque prélèvement sur le terrain[31].

31. On prélève le sédiment de référence près de l'endroit que l'on veut étudier. Idéalement, il possède des caractéristiques géochimiques semblables à celles du sédiment d'essai, mais en étant dépourvu des contaminants d'origine anthropique. Il n'est pas rare que les lieux de

Le nombre de stations d'échantillonnage à l'endroit étudié et le nombre d'échantillons répétés dans chaque station sont propres à chaque étude. Il faudra, la plupart du temps, faire un compromis entre les contraintes logistiques et pratiques (p. ex. le temps et les coûts) et les considérations statistiques. On devrait consulter Environnement Canada (1994) au sujet du plan d'échantillonnage, y compris le nombre minimal recommandé d'échantillons répétés.

À certaines fins de surveillance et d'application des règlements, on devrait prélever sur le terrain de multiples échantillons répétés (c'est-à-dire distincts, prélevés au même endroit, mais dans des carottes différentes ou le contenu différent de bennes preneuses) dans chaque station d'échantillonnage, y compris dans au moins une station de référence (EC, 1992a, 1994 et 1997a ; USEPA, 1994a). Il faut mesurer la toxicité, à l'égard d'*H. azteca*, de chacun de ces échantillons répétés, dans au moins cinq enceintes expérimentales par échantillon répété. L'*analyse statistique de la puissance* (v. § 5.6), au moyen des paramètres de mesure (*survie et croissance*) d'essais antérieurs avec des échantillons provenant de lieux identiques ou semblables, aidera à déterminer s'il est nécessaire de soumettre plus de cinq échantillons répétés en laboratoire à l'essai avec chaque échantillon répété de terrain. En outre, des tests statistiques exigent un nombre minimal d'échantillons répétés. Pour d'autres motifs (p. ex. étude préliminaire ou vaste étude sur la répartition spatiale de la toxicité), le plan de l'étude pourrait prévoir un seul échantillon par station : dans ce cas, normalement, on l'homogénéiserait et on le répartirait entre au moins cinq enceintes expérimentales (répétitions en laboratoires). On se prive ainsi de toute possibilité de détermination de la toxicité moyenne à un emplacement donné (une station), mais cela permet la comparaison statistique de la toxicité de chaque échantillon avec celle du témoin et, si on le souhaite, la comparaison entre les échantillons d'essai (stations).

Pour le prélèvement du sédiment de référence, il faudrait rechercher les endroits où les propriétés géochimiques du sédiment sont semblables à celles du sédiment d'essai. Pour ce genre d'essai, il pourrait ne pas être nécessaire d'apparier étroitement la granulométrie ou la teneur en matières organiques du sédiment, puisque *H. azteca* peut tolérer des sédiments non contaminés dont les caractéristiques diffèrent sur ces points, sans que sa survie ou sa croissance en soient modifiées (§ 1.4). L'appariement de la teneur en carbone organique peut ne pas être indiqué dans les cas où la pollution (p. ex. des usines de pâtes à papier ou égouts) entraîne une forte teneur en matières organiques dans les sédiments d'essai. Des études préliminaires visant à évaluer les propriétés géochimiques et la toxicité du sédiment dans la ou les régions préoccupantes ainsi que dans le voisinage sont utiles à la sélection des endroits propices au prélèvement du sédiment de référence.

On pourrait prélever des échantillons de boues municipales ou industrielles (p. ex. boues résiduaires, résidus miniers essorés, boues de clarificateur ou de bassin de décantation industriel), afin d'évaluer leurs effets nocifs sur la survie et la croissance

---

référence situés à proximité des sédiments d'essai présentent un certain degré de contamination anthropique. Dans certains cas, ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques naturelles pourraient rendre toxique le sédiment de référence (Burton, 1991).

d'*H. azteca*, faire des analyses géochimiques et doser les contaminants. On pourrait aussi prélever d'autres résidus particulaires (p. ex. boues de forage) en vue d'une évaluation toxicologique et chimique.

La méthode de prélèvement (c'est-à-dire carottier, benne, drague ou échantillon composé) dépend des objectifs de l'étude et de la nature des sédiments ou des autres matières particulaires à prélever. Les différents appareils de même que leurs avantages et inconvénients respectifs sont résumés dans EC (1994), et on trouve d'autres détails ailleurs (de Groot et Zschuppe, 1981 ; Baudo *et al.*, 1990 ; Burton, 1992 ; Sly et Christie, 1992 ; ASTM, 1995b).

Pour perturber le moins possible l'échantillon, on devrait utiliser une benne preneuse benthique ou un carottier plutôt qu'une drague. On devrait prélever le sédiment dont on veut évaluer la toxicité et les propriétés chimiques à au moins une profondeur représentative de la couche ou des couches préoccupantes (p. ex. couche superficielle de 2 cm, ou plus profonde si le dépôt de contaminants au cours d'un passé plus ou moins récent est ce qui intéresse).

Il faut également veiller à réduire au minimum les pertes de fines particules au cours du prélèvement. Si on utilise la benne preneuse, il faudrait prélever au moyen de carottiers manuels un échantillon des 2 cm de surface ou de la couche voulue du sédiment d'essai ramené en surface. À cette fin, on ouvre la benne par le haut pour exposer la surface du sédiment non perturbé. On devrait recueillir l'échantillon dans un récipient propre.

Avant d'entreprendre un programme d'échantillonnage, on devrait calculer le volume requis de sédiment par échantillon (EC, 1994), en tenant compte de la quantité exigée pour préparer les répétitions en laboratoire des essais toxicologiques de même que les répétitions exigées pour caractériser la granulométrie, les taux de matière organique et d'humidité et analyser certaines substances chimiques. On a normalement besoin d'au moins 5 à 7 L de sédiment par échantillon (EC, 1994) ; mais cela dépend des objectifs et du plan de l'étude ainsi que de la nature des analyses chimiques à effectuer. Pour obtenir le volume nécessaire, il faut souvent réunir des sous-échantillons prélevés à l'aide du dispositif d'échantillonnage. On devrait suivre les instructions données dans EC (1994) pour obtenir un échantillon composé à partir des sous-échantillons prélevés sur le terrain.

On devrait utiliser dans tous les endroits échantillonnés sur le terrain la même méthode de prélèvement. On devrait consulter EC (1994) pour obtenir plus de conseils sur les dispositifs et les modes opératoires convenables.

5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse de l'échantillon

Les récipients servant au transport et à l'entreposage des échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou de matières particulaires semblables doivent être d'un matériau non toxique. Le choix du récipient dépend à la fois du volume d'échantillon et des éventuelles utilisations finales de l'échantillon. On devrait consulter EC (1994) pour obtenir des indications sur le choix des récipients convenables. Ces derniers doivent être soit neufs, soit avoir été nettoyés à fond puis rincés avec de l'eau d'essai ou une autre

eau non contaminée (p. ex. distillée ou désionisée) avant emploi.

On devrait remplir complètement le récipient de l'échantillon, pour qu'il n'y subsiste pas d'air. Immédiatement après, il faut le sceller, l'étiqueter ou le coder. L'étiquette et les enregistrements doivent alors porter ou comprendre au moins le code ou la description de la nature de l'échantillon (p. ex. prélevé par benne, par carottier, échantillon composé), de son origine, de l'emplacement précis (c'est-à-dire nom de l'étendue d'eau, coordonnées géographiques, profondeur) d'où il provient, le numéro de répétition de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement ainsi que (facultativement) le nom et la signature du ou des préleveurs. Ces derniers devraient aussi conserver en dossier la description des particularités de l'échantillon (nature, aspect, volume) ; de la méthode et du dispositif utilisés ; de toute méthode d'obtention, sur le terrain, d'échantillons composés ou de sous-échantillons de carottes ou d'échantillons prélevés par benne ; du nombre d'échantillons répétés prélevés dans chaque station ; du calendrier des prélèvements ; du nombre de récipients utilisés pour le transport des échantillons et leur nature ; des paramètres physico-chimiques mesurés sur place (p. ex. température, salinité, pH, OD) dans la colonne d'eau et les sédiments ; des méthodes utilisées pour refroidir et transporter les échantillons et des conditions dans lesquelles s'est effectué le transport.

Avec de la glace ou des sachets réfrigérants, on devrait refroidir entre 1 et 7 °C les échantillons tièdes (> 7 °C), dès leur prélèvement, et les maintenir au frais (4 ± 3 °C) et à l'obscurité durant leur transport. Au besoin, on devrait utiliser des sachets réfrigérants ou d'autres moyens de réfrigération pour que la température des échantillons se maintienne entre 1 et 7 °C durant le transport.

Il faut enregistrer la date de réception du ou des échantillons au laboratoire. On devrait aussi mesurer et enregistrer leur température à leur réception. Il faut garder dans des récipients étanches et à l'obscurité, à 4 ± 2 °C, les échantillons à entreposer pour usage ultérieur (EC, 1994 et 1997a). On devrait purger à l'azote l'espace d'air des récipients, puis fermer ces derniers de façon étanche (EC, 1994). Les échantillons ne doivent pas geler, ni en totalité ni en partie, au cours du transport ou de l'entreposage, et on ne doit pas les laisser sécher (EC, 1992a, 1994 et 1997a). On recommande de les soumettre aux essais le plus tôt possible après le prélèvement. L'essai toxicologique devrait débuter dans les deux semaines après le prélèvement, de préférence dans la semaine après, mais pas plus de six semaines après [32].

---

32. La toxicité et les caractéristiques géochimiques des sédiments contaminés de port de Hamilton auraient commencé à s'altérer après plus d'une semaine, mais on n'a pas fourni les données étayant cette affirmation (Brouwer *et al.*, 1990). Othoudt *et al.* (1991) ont constaté que la toxicité d'échantillons de sédiments d'eau douce changeait peu du début à la fin de 7 à 112 j d'entreposage à 4 °C. Burton (1991) et l'USEPA (1994a) signalent diverses études montrant que, parfois, la toxicité d'un sédiment conservé à 4 °C est inaltérée après plusieurs mois et que, dans d'autres cas, on en observe l'altération en quelques jours ou quelques semaines. Le délai recommandé de deux semaines reprend le conseil d'Environnement Canada (1992a, 1997a) à l'égard d'autres essais toxicologiques sur les sédiments. Environnement Canada (1994) recommande le délai admissible maximal de six semaines avant les essais toxicologiques, en raison des difficultés pratiques qu'entraîne un délai plus court et, le cas échéant, du temps pris par les analyses chimiques initiales.

Idéalement, afin d'aider à caractériser l'échantillon, on devrait mesurer sur le terrain les caractéristiques instables du sédiment (p. ex. pH, potentiel d'oxydo-réduction) ou celles sur lesquelles influent les conditions de transport et d'entreposage (p. ex. température). Au laboratoire, on devrait le mélanger à fond (§ 5.3) et en prélever des sous-échantillons représentatifs en vue de la caractérisation physico-chimique. Il faut caractériser chaque échantillon (y compris de sédiment témoin et de référence) par l'analyse, dans des sous-échantillons, des paramètres suivants (USEPA, 1994a) : dans le sédiment entier, la granulométrie (pourcentage de sable grossier, moyen et fin, de limon et d'argile), le pourcentage d'eau et la teneur en carbone organique total ; dans l'eau de porosité, le pH et l'ammoniaque (totale et non ionisée ; v. § 4.5). On pourrait aussi caractériser (USEPA, 1994a ; APHA *et al.*, 1995) : le carbone organique total, les matières volatiles totales, la demande biochimique en oxygène, la demande chimique en oxygène, la capacité d'échange cationique, la teneur en sulfures volatils acides, en métaux, en composés organiques de synthèse, en huiles et en graisses, en hydrocarbures pétroliers et déterminer les diverses caractéristiques physico-chimiques de l'eau de porosité. Sauf indication contraire, on devrait effectuer des analyses chimiques, physiques et toxicologiques identiques sur des sous-échantillons représentatifs de chaque échantillon répété de sédiment prélevé sur le terrain (y compris du sédiment de référence) pour une étude donnée de la qualité des sédiments ainsi que sur un sous-échantillon au moins du sédiment témoin.

5.3 Préparation de l'échantillon en vue des essais

Normalement on ne devrait pas soumettre, en vue des essais, le sédiment prélevé sur le terrain ou les matières particulaires semblables à un tamisage hydraulique, car on éliminerait les contaminants de l'eau de porosité ou ceux dont la sorption sur les grains est faible (EC, 1994). On devrait normalement enlever les gros débris ou les gros macro-organismes indigènes à l'aide de pincettes ou à la main gantée.

Les macro-organismes indigènes peuvent ralentir la croissance d'*H. azteca* au cours des essais de mesure de la toxicité des sédiments d'eau douce et embrouiller l'interprétation des résultats (Reynoldson *et al.*, 1994). Si l'échantillon en renferme beaucoup, que l'on ne peut pas extraire avec des pincettes, on peut passer l'échantillon au travers d'un ou de plusieurs tamis de maillages convenables, par pressage (et non par lavage). Par rinçage, on peut passer au tamis fin (p. ex. à maillage de 0,25 à 0,5 mm ; Day *et al.*, 1995b) les sédiments renfermant de petits macro-organismes impossibles à éliminer par tamisage sous pression mécanique en raison des caractéristiques de ces sédiments. Le liquide de rinçage est celui qui s'est séparé de l'échantillon au cours du transport et/ou de l'entreposage. On doit mêler de nouveau ce liquide avec l'échantillon tamisé (§ 4.1).

Le tamisage pourrait modifier la concentration ou la biodisponibilité des contaminants présents dans le sédiment ou altérer sa granulométrie ou sa teneur en éléments nutritifs (EC, 1994 ; Day *et al.*, 1995b). Si on tamise le sédiment, il est donc recommandé d'en mesurer les propriétés physico-chimiques (p. ex. les métaux présents dans l'eau de porosité, la répartition

granulométrique) avant et après. Dans certains cas, on pourrait devoir aussi effectuer des essais toxicologiques comparatifs sur un sédiment tamisé et un sédiment non tamisé, afin d'élucider l'effet du tamisage sur la toxicité de l'échantillon.

À moins que les objectifs de la recherche ou d'études spéciales n'en décident autrement, on devrait homogénéiser au laboratoire chaque échantillon de matières d'essai prélevé sur le terrain avant de l'utiliser (EC, 1994 ; USEPA, 1994a) [33]. Le mélange peut lui aussi modifier la concentration et la biodisponibilité des contaminants présents dans le sédiment, et l'homogénéisation pourrait ne pas être souhaitable dans tous les cas.

Pour obtenir un échantillon homogène, on le mélange dans le récipient qui a servi à son transport et à son entreposage ou on le transvase dans un récipient propre de mélange. On peut mélanger l'échantillon à l'aide d'un ustensile non toxique (p. ex. cuillère ou spatule d'acier inoxydable), jusqu'à ce que sa couleur et sa texture soient homogènes (EC, 1992a). On peut également utiliser une méthode mécanique (USEPA, 1994a ; EC, 1994). Les conditions du mélange, y compris la durée et la température, doivent être normalisées pour chaque échantillon utilisé dans un essai. Si on doute de l'efficacité du mélange de l'échantillon, on devrait ensuite en prélever des sous-échantillons et les analyser séparément pour en déterminer l'homogénéité.

Immédiatement après le mélange de l'échantillon, il faut prendre les sous-échantillons exigés par l'essai toxicologique et les analyses physico-chimiques et les répartir dans des enceintes expérimentales étiquetées (§ 4.1) et des récipients étiquetés de conservation en vue d'analyses physico-chimiques ultérieures. On devrait alors transvaser dans des récipients étiquetés le reliquat de l'échantillon homogénéisé dont on pourrait avoir besoin pour des essais toxicologiques supplémentaires employant *H. azteca* ou d'autres organismes. On devrait conserver tous les sous-échantillons dans des récipients scellés, sans espace d'air, à l'obscurité, à 4 ± 2 °C (§ 5.2) jusqu'à leur utilisation ou analyse. Immédiatement avant de l'utiliser dans une analyse ou un essai, on devrait mélanger de nouveau à fond chaque sous-échantillon, afin de s'assurer de son homogénéité.

5.4 Eau d'essai

Dans les essais employant un sédiment prélevé sur le terrain ou toute autre matière particulaire semblable, l'eau admise dans les enceintes expérimentales (c'est-à-dire l'eau surnageante) peut provenir de la même source que l'eau utilisée pour l'élevage d'*H. azteca* (v. § 2.3.4 et 3.4). Cette eau peut également provenir d'une source séparée d'alimentation en eau douce ou en eau estuarienne naturelle ou être de l'eau reconstituée. Pour certaines applications, le plan de l'expérience pourrait exiger ou avaliser l'emploi d'eau douce ou estuarienne prélevée dans le lieu de référence à proximité du lieu de prélèvement des sédiments d'essai. Il est souvent judicieux d'employer de l'eau non contaminée locale ou de l'eau non

33. On homogénéise systématiquement les échantillons parce que, entre autres raisons, on veut mélanger de nouveau avec le sédiment toute l'eau de porosité qui remonte à sa surface au cours du transport et de l'entreposage. L'homogénéisation est également nécessaire pour redistribuer les constituants de l'échantillon qui se sont tassés et séparés en couches (d'après la taille des particules) au cours du transport et de l'entreposage.

contaminée dont la dureté est réglée à la dureté de l'eau locale, parce qu'un changement de dureté influe sur la toxicité des métaux et des contaminants organiques présents dans le sédiment. Le § 2.3.4 donne des indications sur la préparation et l'analyse de l'eau qui servira d'eau surnageante.

5.5 Observations et mesures au cours de l'essai

Lorsque l'on met sur pied l'essai, on devrait rédiger une description qualitative de chaque matière d'essai prélevée sur le terrain, notamment de la couleur de l'échantillon, de sa texture et de son homogénéité, en notant la présence de végétaux, d'animaux (y compris de leurs traces ou de leurs trous) [EC, 1992a]. On devrait noter et signaler toute modification de l'aspect des matières et de l'eau que l'on observe pendant l'essai ou à la fin.

On devrait mesurer durant l'essai ou à son début et à sa fin, comme il est décrit au § 4.5, la qualité de l'eau surnageante (p. ex. pH, température, dureté, alcalinité, teneur en ammoniaque, teneur en OD). Selon les objectifs du test et le plan d'expérience, on pourrait aussi prévoir des enceintes séparées au début de l'essai (§ 4.1) pour surveiller les caractéristiques chimiques du sédiment entier et/ou de l'eau de porosité (USEPA, 1994a). Les prélèvements qu'on y ferait, au début et à la fin de l'essai, seraient destructifs. Selon les objectifs de l'étude, on pourrait ajouter ou non des organismes vivants aux enceintes supplémentaires. Pour les dosages portant sur le sédiment ou l'eau de porosité de ces enceintes, on peut siphonner la plus grande partie de l'eau surnageante, sans perturber la surface du sédiment, puis prélever des parties aliquotes du sédiment en vue des analyses qui conviennent (v. § 5.2). Si on voulait analyser l'eau de porosité, la centrifugation sans filtration serait recommandée (EC, 1994 ; USEPA, 1994a). On devrait consulter Environnement Canada (1994) pour obtenir des conseils sur la marche recommandée à suivre pour l'extraction de l'eau de porosité, son traitement et son entreposage avant analyse.

Selon les objectifs de l'étude et la nature du sédiment d'essai (par ex., riche en matières organiques), on pourrait mesurer le pH de l'eau de porosité et doser l'ammoniaque, à mesure que se déroule l'essai, en affectant des enceintes à cette fin (EC, 1994 ; USEPA, 1994a). On pourrait surveiller dans les mêmes enceintes d'autres caractéristiques (par ex., les métaux, le sulfure d'hydrogène, les matières volatiles totales, le potentiel d'oxydo-réduction). Si on voulait surveiller ces variables, on devrait y affecter au moins une enceinte par variante, et les prélèvements y seraient destructifs.

5.6 Paramètres de mesure et calculs

L'interprétation des essais employant des échantillons de sédiments se résume toujours à une comparaison des effets biologiques observés dans ces derniers et des effets observés dans un sédiment de référence. Chaque fois que c'est possible ou convenable, on devrait utiliser un échantillon de référence comme point de comparaison, parce que, ainsi, on obtient une évaluation de la toxicité locale (USEPA, 1994a). Parfois, le sédiment de référence pourrait ne pas convenir aux comparaisons, en raison de sa toxicité ou de caractéristiques physico-chimiques atypiques. Il faudrait alors comparer le sédiment d'essai à un sédiment témoin. Les résultats obtenus à l'aide d'un ou de plusieurs sédiments témoins aident à distinguer les effets des contaminants de

ceux d'autres causes, par exemple la granulométrie ou la teneur en carbone organique. Que le sédiment de référence ou le sédiment témoin serve ou non aux comparaisons statistiques, il faut utiliser les résultats donnés par le sédiment témoin pour juger de la validité et de l'acceptabilité de l'essai (§ 4.2).

L'analyse des résultats diffère selon l'objet de l'essai et son plan d'expérience. Le présent paragraphe aborde les méthodes d'analyse, de la plus simple à la plus complexe. Les méthodes statistiques normales sont généralement tout ce dont on a besoin pour analyser les résultats. On devrait consulter Environnement Canada (1997d), USEPA (1994a, section 14) et USEPA/USACE (1994 ; annexe D) pour obtenir des indications sur les paramètres convenables de mesures statistiques et leurs calculs. Comme toujours, on devrait chercher à obtenir les conseils d'un statisticien qui connaît bien la toxicologie pour établir les plans d'expérience des essais et analyser les résultats.

L'analyse de la variance (ANOVA) et les essais de comparaisons multiples servent souvent à l'interprétation statistique des résultats des essais employant des sédiments. Cette approche, fondée sur les tests d'hypothèses, souffre de points faibles notables, que nous décrivons au § 6.5.3. Relevons par exemple le fait que toute augmentation de la variabilité affaiblira la capacité du test de distinguer les effets toxiques, aboutissant ainsi à un paramètre de mesure qui est une concentration plus forte (c'est-à-dire que le test conclut à une toxicité moindre). De même, l'utilisation d'un petit nombre seulement d'échantillons répétés nuira au pouvoir discriminatoire du test et mènera à la conclusion d'une toxicité apparente moindre, toutes autres choses étant égales (v. § 5.6.2). Il n'existe pas de solution de rechange aux tests d'hypothèse pour l'analyse de la plupart des essais toxicologiques employant des sédiments, parce que ces essais n'emploient d'échantillons que d'une concentration, habituellement non diluée. Des moyens meilleurs permettent d'estimer ponctuellement la toxicité, si les essais portent sur diverses concentrations (v. section 6).

Les analyses paramétriques au moyen de l'ANOVA et de tests de comparaisons multiples partent de l'hypothèse selon laquelle les données obéissent à la loi de distribution normale et que la variance est homogène, d'un groupe à l'autre. Dans un premier temps de l'analyse, on devrait vérifier ces hypothèses au moyen du *test de Shapiro-Wilk* (détermination de la normalité de la distribution des données) et du *test de Bartlett* (sur l'homogénéité de la variance) [Eisenhart *et al.*, 1947 ; Sokal et Rohlf, 1969]. Si, d'après ces tests, les données sont satisfaisantes, on peut procéder à l'analyse. Sinon, on pourrait les transformer (p. ex. en racines carrées, en logarithmes ou en racines carrées d'arc sinus, dans le cas des données quantiques qui doivent servir à l'analyse quantitative ; Mearns *et al.*, 1986). Les tests de normalité et d'homogénéité pourraient ensuite montrer la conformité aux critères de normalité et d'homogénéité et, de fait, c'est une issue probable de la transformation.

Les tests paramétriques sont en réalité tout à fait robustes devant les écarts modérés par rapport à la normalité et à l'égalité de la variance. L'analyse paramétrique (p. ex. ANOVA et comparaisons multiples) devrait donc aller de l'avant, même s'il subsiste une non-conformité modérée après la

transformation. Le fait d'exclure un ensemble de données en raison d'irrégularités mineures pourrait priver l'expérimentateur d'une analyse satisfaisante et sensible ainsi que de la détection des effets réels de la toxicité [34]. On devrait également procéder à l'analyse au moyen de tests parallèles non paramétriques, la plus sensible (celle dont la valeur du paramètre de mesure est inférieure) des deux analyses donnant l'estimation finale de la toxicité (pour plus d'explications et une justification, consulter Environnement Canada, 1977d).

Avec les sédiments, les boues ou les matières particulaires semblables, on pourrait effectuer des tests employant plusieurs concentrations. On pourrait mélanger des quantités mesurées de l'échantillon d'essai avec des quantités mesurées d'un sédiment naturel ou d'un sédiment témoin reconstitué (v. § 3.5 et 6.2). Les méthodes de mélange de différents échantillons de sédiments n'étant pas encore normalisées ni éprouvées (v. § 6.2), il est conseillé de faire attention à l'éventuelle non-linéarité des réactions et des modifications de la biodisponibilité ou des caractéristiques de sorption (Nelson *et al.*, 1994). On recommande au moins cinq sous-échantillons pour fournir des prises d'essai répétées de chaque concentration, afin de déterminer l'homogénéité des échantillons et la précision de l'essai. Nous décrivons dans le § 6.5 les analyses statistiques permettant de déterminer les paramètres de mesure.

5.6.1 Variations dans le plan d'expérience et dans les analyses

Un essai très préliminaire pourrait ne compter qu'un échantillon d'essai et qu'un échantillon de référence, sans répétition. Un simple regard aux résultats pourrait donner une indication sur le plan à donner à des études plus vastes.

Si on avait utilisé un seul échantillon d'essai et un seul échantillon de référence, chacun répétés un nombre égal de fois, le *test t ordinaire de Student* conviendrait à l'analyse (Paine et McPherson, 1991a). Ce test est assez robuste. On devrait l'utiliser dans sa formule intégrale, qui peut alors s'adapter aux données irrégulières. La formule accepte un nombre inégal de répétitions des échantillons d'essai et des échantillons de référence ainsi que l'inégalité de la variance des deux groupes d'échantillons (USEPA/USACE, 1994). Si on n'avait utilisé que des *échantillons répétés de laboratoire*, l'interprétation des résultats serait différente de celle des résultats d'une étude dans laquelle il y aurait des *échantillons répétés de terrain*, comme nous le décrivons ci-dessous à l'égard de l'analyse de la variance.

On pourrait imaginer une étude préliminaire effectuée avec des échantillons prélevés en de nombreuses stations, mais sans répétition sur le terrain ni en laboratoire (intra-échantillon). Le but visé serait de reconnaître un nombre réduit de stations d'échantillonnage qui méritent une étude plus détaillée et plus approfondie. Les

---

34. Les tests de la normalité et de l'homogénéité perdent en signification, en raison des petits échantillons utilisés en écotoxicologie. Les graphiques et l'examen de la nature générale de la répartition et des écarts apparents peuvent être plus révélateurs : ce sont les moyens recommandés (EC, 1977d). L'égalité de la taille des échantillons et l'ampleur des variations sont probablement des facteurs plus importants pour l'issue de l'analyse paramétrique, mais les toxicologues s'y sont peu attardés. La robustesse de l'ANOVA est démontrée par sa capacité de produire des probabilités réalistes si les données sont distribuées de façon raisonnablement symétrique et si le rapport entre les variances de chaque variante va du simple au moins du triple l'une de l'autre (Newman, 1995).

occasions d'analyse statistique seraient limitées. On pourrait comparer les résultats des essais non répétés aux résultats obtenus d'échantillons de référence, en employant des méthodes de détection des valeurs aberrantes (USEPA, 1994a ; Newman, 1995 ; EC, 1997d). L'échantillon serait considéré comme toxique si on en rejetait les résultats parce qu'ils sont extrêmes par rapport aux résultats donnés par des échantillons de référence ou des échantillons témoins.

Une façon plus habituelle d'étudier les sédiments serait de prélever des échantillons en plusieurs endroits, par les mêmes méthodes et en comparant les échantillons avec un seul échantillon de référence ou un seul témoin. Plusieurs pistes s'offrent à l'analyse, selon le type de données et leur qualité, mais, souvent, l'*analyse de la variance (ANOVA)* serait suivie d'un des tests de comparaison multiple. Dans l'ANOVA, on considérerait également l'échantillon de référence comme un « emplacement ».

Dans ces études de plusieurs emplacements, le type de répétition influerait sur l'interprétation des résultats. Il pourrait y avoir un échantillon dans chacun des emplacements, les *échantillons répétés de laboratoire* étant obtenus par subdivision de chaque échantillon. L'ANOVA à un critère de classification distinguerait alors s'il existe une différence générale entre les emplacements, différence supérieure à la variabilité de base dans les méthodes *intralaboratoire* de mise sur pied et de réalisation de l'essai. L'analyse statistique n'évaluerait pas réellement la variabilité du prélèvement des échantillons, sauf que cette variabilité contribuerait à toute différence observée entre les emplacements. Si on prélevait des *échantillons répétés de terrain* dans chacun des emplacements et si on n'utilisait aucun échantillon répété de laboratoire, le même type d'ANOVA à un seul critère de classification évaluerait l'écart général entre les emplacements, en sus de la variabilité *combinée* du prélèvement des échantillons dans l'emplacement et de la réalisation de l'essai. Il serait inhabituel, mais beaucoup plus puissant, de disposer d'échantillons répétés de terrain pour tous les emplacements des échantillonnages et, aussi, d'échantillons répétés de laboratoire de chaque échantillon répété sur le terrain. Ainsi, les échantillons répétés de laboratoire deviendraient les échantillons répétés d'une analyse de variance à un critère niché de classification et ils constitueraient la base de la variabilité pour la comparaison des différences entre les échantillons. L'ANOVA pourrait servir à constater : *a*) s'il existe une différence globale entre les emplacements ; *b*) s'il existe une différence globale entre les échantillons répétés prélevés en divers emplacements. Après l'ANOVA, l'analyse passerait ensuite à un ou plusieurs types de tests de comparaison multiple, que nous décrivons dans le paragraphe ci-dessous.

Après l'application de l'ANOVA aux études réalisées sur plusieurs emplacements, on peut utiliser différents tests statistiques. Si on voulait comparer chacun des emplacements de l'échantillonnage avec l'emplacement de référence, pour voir si les deux sont différents, on devrait utiliser le *test de Dunnett*. Ce test suppose la normalité de la distribution des données et l'égalité des variances. Il se fonde sur une valeur *expérimentale* d'α (la probabilité de déclarer significatif un écart de fait inexistant). Si le nombre de répétitions est inégal, les chercheurs devraient obtenir les conseils d'un statisticien ou adopter la comparaison

complète des emplacements, décrites dans le paragraphe qui suit.

Étudiant plusieurs emplacements d'échantillonnage, le chercheur pourrait vouloir connaître ceux qui diffèrent des autres et ceux qui diffèrent de l'emplacement de référence ou de l'emplacement témoin. Ce serait par exemple le cas d'un certain nombre d'emplacements « en aval de l'émissaire » d'un effluent : on pourrait vouloir connaître les emplacements où la toxicité est significativement supérieure et où la dépollution est particulièrement indiquée. Le *test de Tukey* convient à cette analyse et on le trouve souvent dans les progiciels statistiques. Il peut s'attaquer aux échantillons de tailles différentes[35]. Si on voulait comparer chacun des emplacements d'échantillonnage avec l'emplacement de référence, mais si les données ne se conformaient pas aux exigences de la normalité de leur distribution et de l'égalité de leur variance, on remplacerait l'ANOVA et les tests ultérieurs par des tests non paramétriques. On utiliserait le *test de classement multiunivoque de Steel*, si le nombre de répétitions était égal, tandis que, dans le cas contraire, il faudrait utiliser le *test de Wilcoxon* (de sommations des rangs) avec la *correction de Bonferroni*.

5.6.2 Analyse de la puissance

Un facteur important à considérer dans l'analyse des résultats des essais toxicologiques employant des échantillons de sédiment est le risque d'obtenir des « faux positifs », (c'est-à-dire de conclure qu'un endroit propre est souillé), ou des « faux négatifs » (c'est-à-dire de conclure à la propreté d'un endroit souillé). Les scientifiques, habituellement très prudents quand il s'agit de choisir le niveau de signification (α) pour tolérer les faux positifs (erreur de type I), le fixent habituellement à P = 0,05 ou 0,01. Dernièrement, on a enjoint aux toxicologues de signaler à la fois α et la puissance statistique ($1 - \beta$), c'est-à-dire la probabilité de rejeter avec raison l'hypothèse nulle (H_0) et de ne pas commettre une erreur de type II. Plusieurs facteurs influent sur la puissance statistique, notamment :

- la variabilité des échantillons répétés de la même variante de l'expérience ;
- α (c'est-à-dire la probabilité de commettre une erreur de type I) ;
- l'amplitude de l'effet (c'est-à-dire l'amplitude de l'effet véritable qui est l'objet de l'essai) ;

35. Une autre méthode est actuellement recommandée pour les essais portant sur les sédiments aux États-Unis. (USEPA, 1994a ; USEPA/USACE, 1994). Quand les échantillons répétés sont en nombre égal, la méthode de l'*écart le moins significatif de Fisher* (dit *test LSD [least significant difference] de Fisher*) passe pour être supérieure. Ce test se fonde sur un « taux d'erreur par paire inférieur » relativement à α, dans la comparaison d'un emplacement donné à un autre, mais il maintient la valeur globale d'α à la valeur présélectionnée (habituellement 0,05). Ce test est rarement présent dans les progiciels concernant la toxicité, mais certains manuels le décrivent (p. ex. Steel et Torrie, 1980) et il est exposé en détail dans l'annexe D d'USEPA/USACE (1994). Nous recommandons plutôt le *test de Tukey*, en partie parce que la méthode LSD de Fisher pourrait conclure trop facilement au caractère significatif des écarts. La méthode LSD de Fisher n'est prévue que pour un petit nombre de toutes les comparaisons possibles dans un ensemble de données, et ces comparaisons devraient être précisées d'avance. Dans les recommandations américaines actuelles pour les comparaisons appariées, le nombre inégal de répétitions exigerait d'appliquer la *correction de Bonferroni au test t*, pour remplacer le *test LSD* (USEPA, 1994a). Ce test *t* corrigé permet toutes les comparaisons possibles entre les emplacements.

- n (c'est-à-dire le nombre d'échantillons ou de répétitions utilisées dans l'essai).

On peut servir de l'analyse de puissance pour déterminer *a priori* l'amplitude de l'erreur de type II et la probabilité de résultats faussement positifs. On peut également s'en servir pour s'assurer du nombre convenable d'échantillons répétés de laboratoire et de terrain pour des études ultérieures, qui comprendront l'essai, ou pour aider à la sélection d'éventuels lieux d'échantillonnage. Il est toujours prudent d'utiliser le plus grand nombre économique et logistique possible de répétitions dans le plan d'expérience (v. § 5.1) ; l'analyse de la puissance aidera à cette détermination. On peut trouver dans USEPA (1994a) une bonne explication de la puissance d'un test et de la façon de l'évaluer, tandis qu'il en est question dans une certaine mesure dans EC (1997d).

Modes opératoires particuliers pour les essais employant des sédiments enrichis

Dans la présente section, on trouvera des instructions et des conseils sur la préparation et l'utilisation, dans des essais, de sédiments témoins ou autres, additionnés, pour les besoins de l'expérience, de substance(s) chimique(s), de sédiment contaminé ou de mélanges complexes de déchets. Ces recommandations s'ajoutent aux marches à suivre de la section 4. Environnement Canada (1995) donne des conseils plus détaillés pour enrichir les sédiments et réaliser des essais toxicologiques avec des mélanges de substances chimiques et de sédiments. Selon les objectifs ou les contraintes de l'essai et les lignes directrices ou exigences connexes des règlements, ces essais peuvent se dérouler dans une eau renouvelée quotidiennement ou en conditions statiques (v. section 4). Pour l'application des règlements, on pourrait avoir besoin d'une évaluation et d'une uniformisation plus poussées des méthodes d'enrichissement des sédiments (§ 6.2) avant d'évaluer la toxicité de mélanges précis de sédiments et de substances chimiques à l'aide d'*H. azteca* ou d'autres organismes convenables.

On peut examiner expérimentalement la ou les causes de la toxicité du sédiment et les interactions de la toxicité d'une ou de plusieurs substances chimiques, du sédiment contaminé ou des déchets particulaires réunis à un sédiment (par ailleurs non contaminé), en enrichissant un sédiment témoin *non contaminé* de ces substances ou matières. L'enrichissement pourrait se faire au moyen d'une ou de plusieurs substances chimiques, d'un autre sédiment (contaminé ou non) ou de matières particulaires semblables (p. ex. boue de dragage à laquelle est mélangé du sédiment d'un lieu d'immersion existant ou projeté en eau douce). L'emploi d'une gamme de concentrations d'enrichissement permettrait d'estimer la CL50 et de déterminer les concentrations provoquant des effets sublétaux. L'enrichissement permet aussi de mesurer l'influence des caractéristiques physico-chimiques du sédiment naturel ou artificiel sur la toxicité chimique. Les essais toxicologiques de référence peuvent employer un sédiment témoin enrichi de la substance chimique convenable (v. § 4.8). On trouvera dans la présente section des recommandations et des instructions sur la réalisation d'essais avec un sédiment enrichi. (On trouve des conseils supplémentaires dans USEPA [1994a] et EC [1995].)

6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon

On devrait se renseigner sur les propriétés de la substance chimique, du sédiment contaminé ou du déchet particulaire que l'on veut diluer dans un sédiment témoin ou autre. À l'égard des échantillons de sédiment contaminé ou d'une matière particulaire semblable, on devrait suivre les instructions données sur la caractérisation de l'échantillon (§ 5.2). Pour ce qui concerne les produits chimiques, les substances chimiques (p. ex. les produits formulés) ou les mélanges chimiques individuels, on devrait obtenir l'information qui existe sur la

concentration des principaux ingrédients et des principales impuretés, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation, la toxicité pour l'homme et les organismes aquatiques, la biodégradabilité. Lorsque la solubilité dans l'eau est douteuse ou problématique, on devrait mettre la main sur les modes opératoires acceptables auparavant utilisés pour la préparation des solutions aqueuses des produits chimiques visées, les divulguer, puis déterminer expérimentalement la solubilité du produit dans l'eau d'essai. On devrait obtenir et enregistrer d'autres renseignements disponibles tels que la formule développée, la nature et le pourcentage des impuretés notables, la présence d'additifs et leur quantité, le coefficient de partage entre le *n*-octanol et l'eau.

Les produits chimiques à éprouver devraient au moins être de « qualité réactif », à moins que l'on n'exige un essai sur une préparation commerciale ou un produit de « qualité technique » (USEPA, 1994a). On doit en sceller les récipients, puis les coder et les étiqueter à leur réception. L'information exigée (nom du produit, fournisseur, date de réception, personne chargée des essais, etc.) devrait figurer sur l'étiquette et/ou être enregistrée sur une feuille séparée de données consacrée à l'échantillon, selon ce qui convient le mieux. Les conditions d'entreposage (p. ex. température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. On devrait prélever, étiqueter, transporter et entreposer le ou les échantillons de sédiment contaminé ou de matières particulaires à évaluer après enrichissement, selon les instructions (§ 5.1 et 5.2).

6.2 Préparation des mélanges destinés aux essais

Les chercheurs ont utilisé différentes méthodes pour enrichir un sédiment témoin non contaminé d'une ou de plusieurs substances chimiques ou pour diluer des sédiments contaminés ou d'autres déchets particulaires à l'aide de sédiment témoin, en préparation des essais de mesure de la toxicité des sédiments avec le mélange ainsi obtenu (ASTM, 1991a, b, 1993, 1995a et b ; Burton, 1991 ; USEPA, 1994a ; Hoke *et al.*, 1995). La technique et le temps de mélange de même que, ensuite, la période de maturation peuvent influer sur la toxicité du mélange (USEPA, 1994a).

Les méthodes expérimentales (y compris les méthodes d'addition et de mélange, la période et les conditions d'équilibrage) présidant à l'enrichissement des sédiments sont nouvelles, variées et peu uniformisées. Nous ne pouvons donc pas encore recommander de méthode normalisée. Nous suggérons plutôt des pistes, qui ont servi ou que nous estimons sensées, pour enrichir un sédiment destiné à des essais toxicologiques employant *H. azteca*.

Les rapports d'Environnement Canada (1994, 1995) donnent plus de précisions sur l'enrichissement et l'homogénéisation du sédiment. On devrait les consulter. Les chercheurs qui se proposent d'utiliser dans des essais toxicologiques un ou plusieurs mélanges préparés en laboratoire devraient faire preuve de prudence, en se méfiant : des éventuels problèmes de non-homogénéité de ces mélanges ; des modifications que cela entraîne dans la biodisponibilité et la sorption ; de la non-linéarité éventuelle des réactions toxiques (Nelson *et al.*, 1994).

La méthode d'enrichissement du sédiment dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance ou de la matière d'essai, à mélanger au sédiment témoin ou autre. Souvent, on prépare le mélange en prenant une ou plusieurs parties d'une solution mère de produit chimique et en les intégrant, par mélange, dans du sédiment témoin (Swartz *et al.*, 1985b et 1988 ; ASTM, 1991a et 1993). On exprime souvent la concentration dans le sédiment en µg/g ou en mg/kg de poids sec (Swartz *et al.*, 1985b et 1988), mais la concentration rapportée au poids humide pourrait être plus utile pour corréler les résultats à la toxicité du sédiment (Burton, 1991). Selon la nature de la substance ou de la matière d'essai et les objectifs de l'essai, on pourrait aussi rapporter les concentrations à la teneur des sédiments en carbone organique (p. ex. pour évaluer la toxicité des composés organiques non polaires) ou à la teneur en sulfures volatils acides (p. ex. pour évaluer la toxicité des métaux) [Di Toro *et al.*, 1990 et 1991 ; ASTM, 1991a et 1993 ; USEPA, 1994a].

Pour préparer des solutions mères, on préfère comme solvant l'eau d'essai (v. § 2.3.4 et 3.4) ; on devrait éviter les autres solvants que l'eau, sauf nécessité absolue. Pour diluer les composés organiques ou autres peu solubles dans l'eau, on peut utiliser un solvant organique miscible dans l'eau pour aider à disperser les composés dans l'eau (Borgmann *et al.*, 1990 ; ASTM, 1991a et 1993 ; USEPA, 1994a). On a recommandé le triéthylèneglycol en raison de sa faible toxicité pour les organismes aquatiques, sa faible volatilité et sa grande capacité de dissoudre de nombreuses substances organiques (ASTM, 1991a et 1993). On peut utiliser d'autres solvants tels que le diméthylsulfoxyde, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone pour préparer les solutions mères de substances organiques, mais ces solvants peuvent contribuer à la toxicité de l'échantillon, modifier les propriétés du sédiment ou s'échapper du milieu d'essai en raison de leur volatilité. On ne devrait pas utiliser de surfactifs (ASTM, 1991a et 1993).

Si on utilise un solvant organique, l'essai doit comporter un témoin constitué de sédiment non contaminé (c'est-à-dire sans solvant ni substance d'essai) et un témoin constitué de sédiment et du solvant. Ce dernier témoin doit renfermer le solubilisant à la concentration maximale où il se trouve dans les mélanges de sédiment et de substance d'essai. Le solvant doit provenir du lot qui a servi à préparer la solution mère (ASTM, 1991a et 1993 ; USEPA, 1994a).

On devrait utiliser les solvants avec parcimonie, puisqu'ils pourraient contribuer à la toxicité du sédiment d'essai. Leur concentration maximale dans le sédiment ne devrait pas influer sur la survie ou la croissance d'*H. azteca* au cours de l'essai. Si on ne connaît pas cette concentration, on devrait effectuer un essai préliminaire, *avec solvant seulement*, à diverses concentrations dans du sédiment témoin, afin de déterminer la concentration-seuil du solvant que l'on envisage d'utiliser dans l'essai définitif.

Le mélange des parties de solution mère de produit(s) chimique(s) d'essai avec du sédiment témoin ou un autre sédiment devrait être homogène. On peut le faire à la main (p. ex. à l'aide d'une spatule ou d'une tige de verre propre) ou mécaniquement (p. ex. Ditsworth *et al.*, 1990). On peut également enduire les parois d'une fiole avec du produit, puis ajouter une suspension aqueuse (c'est-à-dire du sédiment témoin et de l'eau d'essai). On agite ensuite le contenu de la fiole. On peut aussi ajouter un volume

mesuré de la solution mère directement dans une suspension aqueuse du sédiment témoin (ou autre) dans l'eau d'essai, agiter le tout et laisser reposer (EC, 1992a). D'autres méthodes de mélange pourraient se révéler acceptables, à la condition que le produit chimique s'avère uniformément réparti dans le sédiment. Pour chaque variante de l'essai, il faut uniformiser les conditions de brassage, y compris le rapport solution/sédiment, la durée et la température de brassage et de conservation. La durée du brassage du sédiment enrichi devrait assurer la répartition homogène de la substance. Cela peut prendre de quelques minutes à 24 h. Pendant l'opération, on devrait maintenir basse la température afin de réduire au minimum l'altération physico-chimique du mélange et l'activité microbienne. Il est conseillé d'analyser des sous-échantillons du mélange afin de déterminer le degré de brassage et l'homogénéité (Ditsworth *et al.*, 1990 ; USEPA, 1994a).

Pour certaines études, on pourrait devoir ne préparer qu'une concentration d'un mélange donné de sédiment témoin (ou autre) et de produit(s) chimique(s) ou le mélange d'une seule concentration de sédiment contaminé ou de déchet particulaire dans du sédiment témoin ou autre. Par exemple, on pourrait effectuer un essai avec une seule concentration de produit chimique ou de déchet particulaire dans un sédiment non contaminé pour déterminer si cette concentration est toxique pour *H. azteca*. Cette application pourrait servir à l'application des règlements ou à la recherche.

On devrait ajouter plusieurs concentrations d'un produit chimique à du sédiment témoin ou autre dans des conditions normalisées pour chiffrer les paramètres de mesure (p. ex. CL50, CIp, CSEO, CEMO ; v. § 6.5) des mélanges utilisés. Conviendrait aussi un essai avec sédiment témoin enrichi de plusieurs concentrations d'un déchet particulaire donné. Il faut alors au moins cinq concentrations, plus un témoin ; il est recommandé de préparer et d'utiliser de six à huit concentrations (plus un sédiment témoin au moins) pour améliorer la probabilité de cerner chaque paramètre de mesure recherché. On peut se servir d'une suite de dilutions formant une série géométrique, chaque concentration de produit ou de déchet particulaire dans le sédiment étant au moins la moitié de la précédente dans la série (p. ex. 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 mg/kg)[36]. Les dilutions peuvent aussi former des séries logarithmiques (v. annexe H). Pour déterminer l'intervalle convenable des concentrations, on peut effectuer un essai préliminaire, qui en englobera une gamme plus large.

On doit organiser les essais destinés à évaluer la toxicité de mélanges de substance(s) ou matière(s) dans un sédiment témoin, pour les besoins de l'homologation fédérale ou l'application d'un règlement, en prévoyant au moins cinq répétitions de chaque concentration à analyser et de chaque sédiment témoin à utiliser dans l'essai. Comme l'objet de l'essai avec concentrations multiples est de déterminer à la fois la CL50 (données sur la mortalité) et la CIp (données sur le poids sec), il est recommandé d'utiliser dans l'essai six à huit concentrations plus un ou des témoins. On pourrait réduire le nombre de répétitions par variante ou les supprimer tout à fait si les essais visent à

---

36. Dans les sédiments, la concentration s'exprime normalement en µg/g ou en mg/kg de poids sec ou humide. Dans l'eau de porosité, elle pourrait parfois s'exprimer en µg/L ou en mg/L.

déterminer des intervalles. On pourrait faire de même, selon les écarts prévus entre les enceintes expérimentales affectées à une variante de l'essai, si les essais servent au dépistage à des fins non réglementaires ou à des fins de recherche.

Nous recommandons, conformément à un usage répandu (USEPA, 1994a) de laisser vieillir les mélanges de sédiment enrichi quatre semaines avant d'entreprendre l'essai. Si de nombreuses études ont débuté dans les heures ou les jours qui ont suivi la préparation des mélanges enrichis, ces délais courts et variables pourraient ne pas suffire pour l'équilibrage des constituants du sédiment témoin. En prévoyant un vieillissement constant de quatre semaines avant l'essai toxicologique, on assurerait une certaine uniformisation des comparaisons intra- et interlaboratoires des résultats. Dès sa préparation, on devrait recueillir chaque mélange dans un récipient convenable, sceller ce dernier (sans espace d'air) et le conserver à l'obscurité à 4 ± 2 °C (§ 5.2) pendant quatre semaines avant de l'utiliser.

Selon les objectifs de l'essai, il pourrait être souhaitable de déterminer l'effet des caractéristiques du substrat (p. ex. granulométrie ou teneur en matière organique) sur la toxicité des mélanges de produits chimiques et de sédiment. Par exemple, on pourrait mesurer l'influence de la granulométrie du sédiment sur la toxicité du produit chimique, par des essais parallèles avec plusieurs concentrations, à l'aide d'une série de mélanges du produit chimique dans différentes fractions (c'est-à-dire de granulométrie différente) ou des types différents de sédiment naturel ou artificiel témoin (§ 3.5). De même, on pourrait examiner dans quelle mesure la teneur en matière organique du sédiment peut modifier la toxicité chimique, par des essais parallèles, avec plusieurs concentrations de différents mélanges de produits chimiques et de sédiment préparés avec une série de sédiments témoins enrichis de matière organique. On devrait intégrer dans l'essai, à titre de témoin, chaque fraction ou préparation de sédiment témoin artificiel ou naturel que l'on a employée à la préparation de ces mélanges.

On pourrait devoir mesurer l'effet, sur la survie et le poids d'*H. azteca*, d'une ou de plusieurs concentrations de produits chimiques donnés, introduits dans l'enceinte expérimentale sous forme de solutions recouvrant le sédiment. Le mode opératoire de la préparation de ces concentrations pourrait varier selon les objectifs de l'étude. On pourrait, par exemple, ajouter avec soin la ou les solutions d'essai dans des enceintes supplémentaires renfermant une couche de sédiment témoin ou autre (p. ex. prélevé sur le terrain), sans ensuite mélanger ni perturber le sédiment et les solutions d'essai ; ou agiter les solutions d'essai introduites dans les enceintes pendant une période déterminée, en présence du sédiment, avant l'introduction des organismes. Les interactions entre les produits chimiques et le sédiment pourraient différer considérablement selon l'approche suivie et pourraient aboutir à des résultats notablement différents. Pour préparer chaque solution d'essai, on devrait utiliser, sauf indication du contraire, de l'eau d'essai, réglée à 23 ± 1 °C (§ 6.3). Il faut préparer et traiter de même les témoins des échantillons répétés, y compris, le cas échéant, les témoins de(s) solvant(s). Les instructions que nous avons fournies dans la présente section sur l'emploi des solvants autres que l'eau sont à suivre dans la préparation des témoins renfermant un solvant.

6.3 Eau d'essai et eau témoin ou eau de dilution

L'eau de préparation des solutions mères ou des solutions filles et l'eau servant aux essais d'une durée de 14 j en présence de mélanges de sédiment enrichi devraient normalement être de l'eau d'essai non contaminée (v. § 3.4). Cette eau peut être reconstituée ou naturelle. Il n'est pas obligatoire que ce soit l'eau qui a servi à l'élevage des organismes d'essai (v. § 2.3.4). Si on vise un haut degré d'uniformisation, une eau reconstituée, d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$ par litre, est recommandée (§ 2.3.4 : USEPA, 1994a). Par exemple, nous recommandons une eau reconstituée ordinaire dans les cas où on doit comparer et évaluer la toxicité mesurée du mélange de produits chimiques et de sédiment par rapport aux résultats obtenus dans un certain nombre d'installations expérimentales sur les mêmes produits chimiques ou d'autres.

6.4 Observations et mesures expérimentales

Lorsqu'on met l'essai sur pied, on devrait faire la description qualitative de chaque mélange de sédiment enrichi et de l'eau surnageante : couleur, texture, homogénéité apparente du sédiment, couleur et opacité de l'eau surnageante, notamment. Toute modification de l'aspect du mélange ou de l'eau surnageante observée au cours de l'essai ou à la fin est à noter. On devrait mesurer la qualité de chaque mélange de sédiment enrichi (y compris du sédiment témoin) et de l'eau surnageante et l'enregistrer selon la modalité décrite aux § 4.5, 5.2 et 5.5.

Si les capacités de l'analyse l'autorisent, il est recommandé d'analyser les solutions mères, l'eau surnageante, le sédiment entier, l'eau de porosité et les solutions filles (le cas échéant), afin de doser les concentrations et de déterminer si le sédiment a été enrichi de façon satisfaisante. Pour les cas où des dosages sont nécessaires, on devrait au moins prélever des parties aliquotes de l'échantillon à des concentrations forte, moyenne et faible, au début et à la fin de l'essai. On devrait préserver, entreposer et analyser ces prises d'essai en suivant chaque fois des méthodes convenables et éprouvées.

À moins d'avoir de bonnes raisons de croire que les dosages ne sont pas précis, on devrait calculer et exprimer les résultats des essais toxicologiques en concentrations moyennes mesurées à la fois pour le sédiment entier (µg/kg ou mg/kg de poids sec) et l'eau de porosité (µg/L ou mg/L). Si on dose un produit ajouté à l'eau surnageante, on devrait, là aussi, arriver à une concentration moyenne mesurée dans le sédiment et l'eau de porosité, et, en plus, divulguer les concentrations moyennes établies pour les solutions d'essai recouvrant les sédiments (EC, 1992a).

6.5 Paramètres de mesure et calculs

Les essais employant plusieurs concentrations de mélanges de sédiment enrichi se caractérisent par la CL50 après 14 j et un paramètre de mesure représentant des données sur le poids des organismes (p. ex. la CIp). Nous faisons la présentation sommaire des statistiques et des programmes convenant au calcul de ces paramètres dans les pages qui suivent. Dans le § 5.6, nous avons donné des indications sur le calcul et la comparaison des paramètres de mesure statistiques d'essais effectués avec une seule concentration de mélanges de sédiment enrichi. Aux chercheurs qui veulent en savoir

plus sur les statistiques paramétriques ou non paramétriques qui s'appliquent aux paramètres de mesure, il est recommandé de consulter le rapport d'Environnement Canada sur les statistiques utiles à la détermination des paramètres de mesure toxicologiques (EC, 1997c) de même qu'USEPA (1994a, b et c) ou USEPA/USACE (1994).

6.5.1 Concentration létale médiane (CL50)

Quand on effectue un test employant des concentrations multiples de mélanges de sédiment enrichi (§ 6.2), on doit se servir des résultats quantiques sur la mortalité pour calculer la *concentration létale moyenne (CL50)* après 14 j et ses limites de confiance à 95 %. Pour estimer la CL50, on réunit toutes les données sur le taux de mortalité après 14 j observés dans toutes les répétitions de l'expérience et à chaque concentration. Si la mortalité n'est pas au moins égale à 50 % à une concentration donnée, on ne peut pas estimer la CL50. Si une concentration donnée correspond à un taux de mortalité nul, on parle d'un *effet de mortalité nulle* (0 %), et on utilise cette information. Toutefois, si plusieurs concentrations successives correspondent à autant de taux nuls de mortalité, on ne se sert que de la concentration maximale de cette série pour estimer la CL50 (c'est-à-dire l'effet nul le plus rapproché de la médiane de la distribution des données). De même, si on observait une série de taux de mortalité de 100 % aux concentrations élevées utilisées pour l'essai, on ne se servirait que d'une valeur de l'effet total : celle qui correspond à la concentration minimale. Ces deux restrictions s'appliquent à toute forme d'analyse statistique et à toute construction graphique manuelle.

Divers programmes informatiques permettent de calculer la CL50. Stephan (1977) a construit un programme pour estimer la CL50 à l'aide des probits, des moyennes mobiles et de la méthode binomiale et il l'a adapté à l'ordinateur personnel compatible IBM. Nous recommandons ce programme en langage BASIC, que l'on peut se procurer sur disquette [37] d'Environnement Canada (adresse donnée dans l'annexe B). On peut utiliser d'autres méthodes informatiques et manuelles satisfaisantes (p. ex. USEPA, 1985a ; Hubert, 1987 ; APHA *et al.*, 1995 ; EC, 1997d). On peut utiliser sur ordinateur PC des programmes employant la méthode élaguée de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1997), mais nous ne les recommandons pas parce que, entre les mains de novices peu sensibilisés aux conséquences de l'élagage des données extrêmes de la relation dose-réponse, ils pourraient donner des résultats divergents.

Le programme recommandé de Stephen (1977) permet d'estimer la CL50 et les limites de confiance par chacune des trois méthodes, si l'ensemble de données compte au moins deux taux partiels de mortalité. Si l'on recherche des données lissées ou régulières, les trois méthodes donneront vraisemblablement des résultats semblables, et on devrait préférer et divulguer les résultats de l'analyse par probits. La méthode des probits donne également la pente de la courbe, que l'on devrait communiquer. L'estimation obtenue par la méthode binomiale pouvant différer quelque peu des autres résultats, elle ne devrait servir qu'en dernier recours. Si les résultats ne comprennent pas deux taux partiels de

37. Grâce à l'amabilité du Dr Charles E. Stephen (USEPA, Duluth [MN]).

mortalité, on ne peut utiliser que la méthode binomiale pour estimer au mieux la CL50. Cette méthode n'estime pas les limites officielles de confiance. Elle donne plutôt les limites extérieures d'un intervalle dans lequel se trouveraient la CL50 et les véritables limites de confiance.

Il faudrait vérifier la CL50 calculée par l'ordinateur en examinant un diagramme, à l'échelle log-probabilité, des taux de mortalité au jour 14, aux diverses concentrations analysées (APHA *et al.*, 1995 ; EC, 1997d). Il faut résoudre tout écart important entre la CL50 estimée au moyen de ce graphique et la CL50 calculée par ordinateur. Pour cette vérification, on préfère un graphique construit à la main. Un graphique dessiné par l'ordinateur ferait l'affaire s'il était fondé sur des échelles log-probabilité. Si l'introduction des données avait été entachée d'une erreur, le graphique produit par l'ordinateur l'aurait répétée, comme l'analyse mathématique. C'est pourquoi le chercheur devrait vérifier rigoureusement les coordonnées des points sur les graphiques.

La figure 2 est le graphique construit à la main du taux de mortalité en fonction de la concentration pour estimer la CL50. Dans cet exemple hypothétique, on compte 100 amphipodes (cinq répétitions de 20 organismes, à chaque concentration) soumis expérimentalement à chacune des cinq concentrations. La figure se fonde sur des concentrations de 1,8, de 3,2, de 5,6, de 10 et de 18 mg de produit chimique par kilogramme de sédiment, qui provoquent des taux de mortalité de 0, de 20, de 40, de 90 et de 100 % des amphipodes qui y sont exposés respectivement pendant 14 j. On peut déterminer visuellement la concentration que l'on s'attend à être létale pour la moitié des amphipodes en repérant le point de la courbe la mieux ajustée qui correspond au taux de 50 % (trait discontinu), puis en descendant de ce point jusqu'à l'axe horizontal pour obtenir la CL50 estimative (5,6 mg/kg). On pourrait construire un graphique semblable avec les données reliant la mortalité à la concentration à l'aide de la concentration mesurée moyenne (en µg/L ou en mg/L) déterminée à l'analyse de l'eau de porosité (v. § 6.4).

En ajustant une courbe comme celle de la figure 2, on devrait veiller davantage aux points près du taux de mortalité de 50 %. On peut se procurer du papier log-probabilité (« log-probit », comme dans la figure 2) dans les bonnes librairies techniques ou les commander par leur truchement.

Pour l'ensemble régulier de données à l'origine de la figure 2, les programmes informatiques donnent des estimations très semblables à celle de la méthode graphique. Les CL50 (et leurs limites de confiance à 95 %) étaient les suivantes :

Méthode de Stephan (1977)		
• probits	5,58	(4,24 et 7,37)
• moyennes mobiles	5,58	(4,24 et 7,33)
• méthode binomiale	6,22	(entre 1,8 et 10)
Analyse de Hubert par la méthode des probits (1987) :	5,56	(4,28 et 7,21)
TOXSTAT 3.4	5,58	(4,34 et 7,12)
SAS (1988), analyse des probits	5,58	(4,26 et 7,40

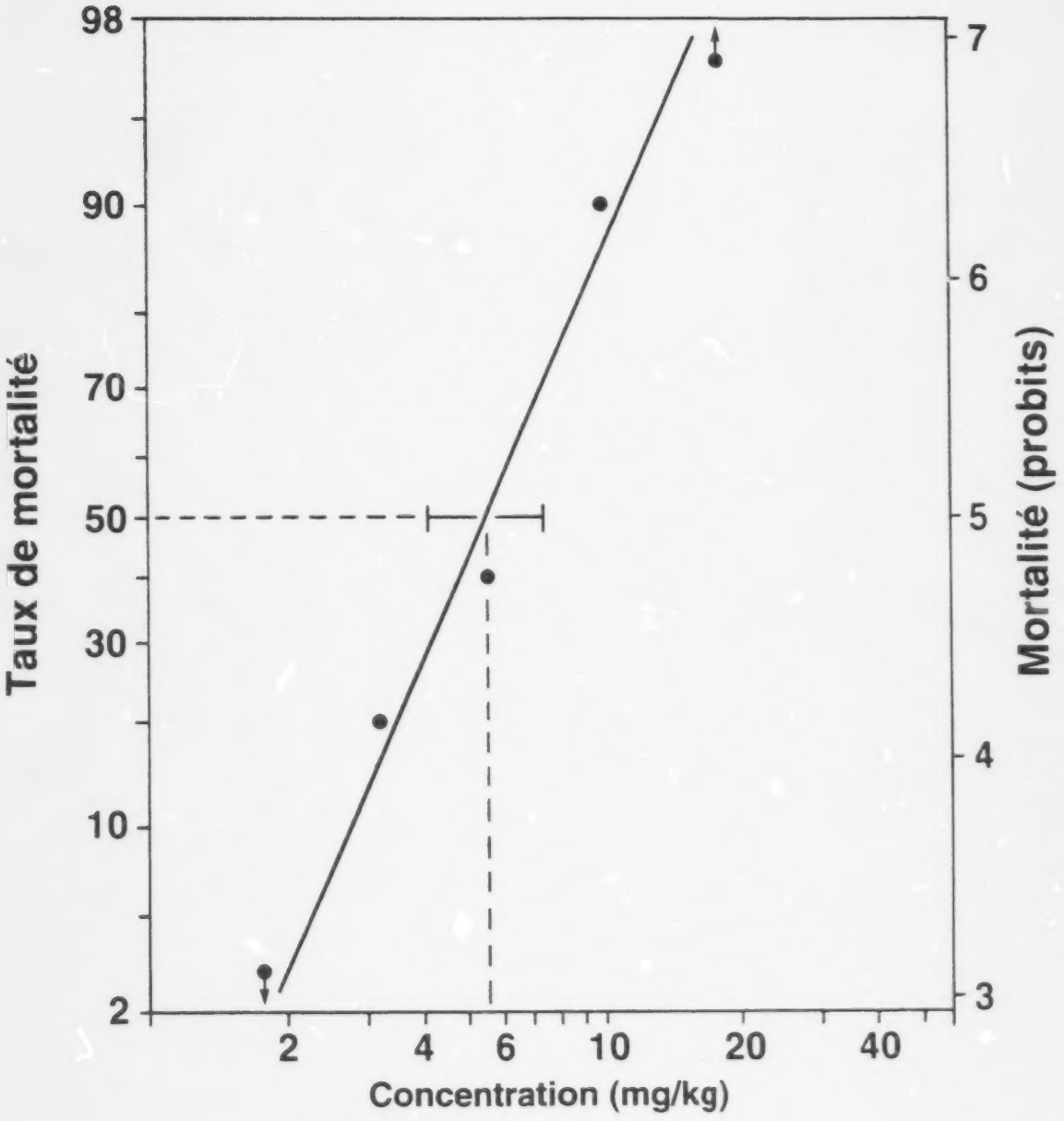


Figure 2. — Estimation de la concentration létale médiane, par établissement du graphique des taux de mortalité sur papier log-probabilité

Si on incluait dans l'étude un témoin du solvant, on devrait comparer statistiquement le poids sec des organismes des échantillons répétés du sédiment témoin renfermant du solvant et du sédiment témoin non contaminé. À cette fin, on peut appliquer le test *t* de Student (§ 5.6.1). Si les poids diffèrent sensiblement entre les deux témoins, on peut seulement utiliser le témoin de solvant comme base de comparaison et pour le calcul des résultats. S'ils ne diffèrent pas, on devrait utiliser les résultats des deux témoins pour évaluer les conditions d'acceptabilité de l'essai et comme base du calcul des résultats (USEPA, 1994a). L'essai est invalide si plus de 20 % des amphipodes mis en présence de l'un ou l'autre des sédiments témoins meurent au cours de l'essai.

6.5.2 Concentration inhibitrice (CIp) [p correspondant à un pourcentage d'effet]

Pour les données sur le poids sec moyen, la CIp (*concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précisé*) est le paramètre statistique recommandé. C'est une estimation quantitative de la concentration causant un pourcentage précisé de réduction du poids sec moyen des organismes d'essai (par exemple, la CI25 et la CI20 représentent respectivement une réduction de 25 et 20 %). C'est le chercheur qui choisit le pourcentage, 25 et 20 % étant les taux les plus utilisés. Toute CIp calculée et publiée doit comprendre ses limites de confiance à 95 %.

Le poids moyen des organismes d'essai se calcule par le poids sec total des amphipodes ayant survécu dans une enceinte donnée, divisé par le nombre d'organismes ayant survécu à la fin de l'essai (§ 4.7). On exclut de l'analyse l'enceinte (assimilée à une répétition) où aucun organisme n'a survécu. On exclut de même la concentration dont toutes les répétitions correspondent à une mortalité totale.

Actuellement, la seule méthode facilement accessible d'estimation de la CIp et de ses limites de confiance à 95 % est la méthode « bootstrap » informatisée (Norberg-King, 1993) dont le programme s'appelle *ICPIN* (USEPA, 1994b et c). Public, ce programme peut être obtenu de l'USEPA et il fait partie de la plupart des logiciels d'écotoxicologie, y compris TOXSTAT. Les instructions d'origine, de l'USEPA, sont claires, ce qui facilite l'utilisation du programme (Norberg-King, 1993)[38]. Une version antérieure portait le nom de BOOTSTRP.

Pour l'analyse, l'ICPIN n'exige pas un nombre égal de répétions de concentrations différentes. L'estimation de la CIp se fait par lissage des données, dans la mesure nécessaire, puis utilisation des deux données voisines de la CIp choisie (USEPA, 1994b et

---

38. Les instructions dans Norberg-King (1993) sèment parfois la confusion sur ce qu'est une « répétition ». Le terme est utilisé de telle façon qu'il s'appliquerait au poids que chaque organisme dans la même enceinte. Ce lapsus ne nuit en rien au bon fonctionnement du programme.

Les progiciels du commerce vendus en 1996 étaient plus déroutants pour l'introduction des données et l'analyse, que le programme d'origine de l'USEPA (Norberg-King, 1993). Certains progiciels étaient rebelles, et les guides très nébuleux. Les progiciels actuels du commerce exigent et livrent généralement une information particulière, selon les spécifications de l'USEPA, qui ne satisfont pas nécessairement aux exigences d'Environnement Canada. Un programme du commerce pourrait être construit pour des ordinateurs personnels assez modernes (depuis 1996) ; l'un deux exigeait assez de mémoire classique (au moins 610 kilo-octets libres) pour qu'il en reste peu pour les autres programmes.

c). On ne peut pas calculer la CIp sans les concentrations inférieure et supérieure ; ces deux concentrations devraient exercer un effet suffisamment rapproché de la valeur choisie de *p*, de préférence à moins de 20 % de distance. Pour le moment, le programme n'utilise pas l'échelle logarithmique des concentrations, de sorte que les utilisateurs canadiens doivent introduire les concentrations sous forme logarithmique. Certains progiciels du commerce sont capables, c'est là une de leurs fonctionnalités de base, d'effectuer la transformation logarithmique, mais les chercheurs devraient s'assurer de la conservation de cette fonctionnalité en passant à ICPIN. Ce dernier estime les limites de confiance par une technique spéciale de « bootstrap », parce que les méthodes habituelles ne seraient pas valides. Par cette technique, on effectue de nombreux « rééchantillonnages » des mesures originales. Le chercheur doit en préciser le nombre, qui peut varier de 80 à 1 000. On recommande comme minimum 400, et celui de 1 000 donnerait de bon résultats[39].

Outre la détermination et la publication d'une CIp calculée par ordinateur, on pourrait produire un graphique du pourcentage de réduction du poids sec en fonction du logarithme de la concentration, pour vérifier l'estimation mathématique et fournir une évaluation graphique (visuelle) de la nature des données (EC, 1997d).

Si on incluait dans l'étude un *témoin du solvant*, on pourrait comparer statistiquement le poids des amphipodes survivants dans les répétitions aux poids dans le témoin utilisant du sédiment non contaminé. On peut alors utiliser le *test t de Student*. Si les poids diffèrent de façon significative entre les deux témoins, on ne peut utiliser que le témoin du solvant comme base de comparaison et du calcul des résultats. Si les résultats sont les mêmes, on devrait utiliser les données des deux témoins pour évaluer l'acceptabilité de l'essai et comme base de calcul des résultats (USEPA, 1994a). Le test est invalide si plus de 20 % des amphipodes de l'un des sédiments témoins meurent au cours de l'essai.

6.5.3 Test d'hypothèse (CSEO et CEMO)

Une autre façon de présenter les résultats de l'essai est de déterminer la *concentration sans effet observé (CSEO)*, la *concentration à effet minimal observé (CEMO)* et la *concentration avec effet de seuil observé (CESO)*. Pour ces essais avec sédiment enrichi, on calcule la CSEO et la CEMO à partir du poids sec moyen des amphipodes survivants dans chaque répétition (enceinte) du témoin et des diverses concentrations. Pour les calculs, on utilise les données sur l'effet sublétal qui ont servi à estimer la CIp. On exclut de l'analyse la répétition ou la concentration correspondant à la mortalité totale[40].

---

39. Le programme ICPIN possède des points faibles. Sa méthode d'interpolation n'utilise pas les données au mieux et elle est sensible aux particularités des deux concentrations utilisées. Le programme omet d'adopter le logarithme de la concentration, biais qui favoriserait une CIp plus forte. En modifiant la méthode bootstrap, on a pu remédier à un problème de limites de confiance trop étroites. La régression linéaire ou la régression générale estimeraient mieux la CIp et ses limites à 95 % (EC, 1997d), mais on n'a pas mis au point de progiciel standard de régression pour l'écotoxicologie. Les chercheurs devraient rester à l'affût d'un nouveau programme qui leur conviendrait.

40. On peut concevoir une mortalité importante à des concentrations inférieures à celles qui influeraient sur le poids moyen. Bien que d'autres méthodes d'analyse puissent quantifier cet effet sur la mortalité, la CL50 est le seul paramètre de mesure

Les méthodes statistiques sont expliquées, exemples à l'appui, dans USEPA (1994a, b et c), USEPA/USACE (1994), Newman (1995), EC (1997d), et dans les progiciels du commerce tels que TOXSTAT (WEST Inc. et Gulley, 1996). Elles débutent par une vérification de la normalité et de l'homogénéité des variances par les *tests de Shapiro-Wilks* et de *Bartlett*. Si les données, originales ou transformées (§ 5.6) satisfont aux deux essais, l'analyse devrait se faire par des méthodes paramétriques.

Comme tests paramétriques, on effectue l'*analyse de la variance (ANOVA)*, puis le *test de Williams*, test de comparaison multiple qui détermine quelles concentrations diffèrent significativement du témoin. Le test de Williams tient compte de l'ordre de la grandeur des concentrations, caractéristique recherchée pour accroître la sensibilité et convenant beaucoup à la plupart des essais toxicologiques (Masters *et al.*, 1991)[41]. Il permet d'estimer l'*écart significatif minimal (ESM)*. C'est la grandeur de l'écart dans les poids moyens qui devrait exister entre les témoins et une concentration d'essai afin de conclure à un effet significatif correspondant à cette concentration. Tout essai sur lequel on publie la CSEO ou la CEMO exige que l'on précise l'ESM, Si l'ESM des poids moyens est supérieur à 25 % du poids moyen des témoins, on peut douter de la validité et de l'utilité des constatations.

Si le nombre de répétitions est inégal, en raison d'une perte accidentelle ou pour d'autres causes, on remplace le test de Williams par le *test t modifié par Dunn-Sidak* ou le *test t corrigé par Bonferroni*.

Si la transformation des données ne satisfait pas aux tests de la conformité et de l'homogénéité, on devrait passer à l'analyse paramétrique, sauf en cas d'écart important de la normalité, ce qui, de toute évidence, ne cadrerait pas avec cette analyse. Les tests paramétriques sont relativement robustes aux non-conformités modérées (v. § 5.6). On devrait aussi effectuer une analyse non paramétrique. La plus sensible des deux analyses (qui donne des concentrations inférieures) doit servir à l'estimation finale de la CSEO et de la CEMO. Dans ce cas, il faut inclure dans le rapport détaillé les éléments suivants :

- les résultats des *tests de Shapiro-Wilks* et de *Bartlett* ;
- un graphique tracé à la main des poids moyens par enceinte, dans lesquels les concentrations sont sous forme logarithmique ;
- les conclusions d'une analyse paramétrique y compris l'ESM ;
- les conclusions de l'analyse non paramétrique.

L'analyse non paramétrique exige quatre répétitions[42]. Le *test de Shirley* serait la méthode de choix plutôt que l'analyse de

---

de la mortalité qu'il faut publier pour cet essai de mesure de la toxicité des sédiments.

41. Un autre test de comparaison multiple standard, le *test de Dunnett*, est privilégié dans TOXSTAT et dans la plupart des méthodes américaines. Ce n'est pas une façon particulièrement puissante de distinguer les effets, puisqu'il ignore la grandeur des concentrations quand il calcule l'écart significatif minimal (Masters *et al.*, 1991).

42. Cette exigence pourrait empêcher l'estimation de la CSEO et de la CEMO. Un essai pourrait avoir été conçu avec moins de répétitions, principalement pour calculer la CIp. Si les résultats devaient se révéler s'écarter de la normalité ou de l'homogénéité, le chercheur ne pourrait pas parachever son analyse par des méthodes non paramétriques.

variance. À l'instar du test de Williams, il prend en considération le rang des concentrations. Malheureusement, il n'est pas disponible dans la plupart des progiciels statistiques et il n'est pas décrit non plus dans la plupart des manuels. Le *test multiunivoque de Steel* est offert dans la plupart des progiciels statistiques des États-Unis et il pourrait servir, à ce titre, bien qu'il ne tienne pas compte de l'ordre des concentrations. Si le nombre de répétitions n'était pas égal, on devrait utiliser le *test de sommation des rangs de Wilcoxon*. Ces tests sont des outils puissants, pour les données qui ne sont pas normalement distribuées, mais ils seraient moins puissants que les tests paramétriques s'ils étaient utilisés sur des données dont la distribution est normale.

On calcule souvent la *CESO*, moyenne géométrique de la CSEO et de la CEMO, parce qu'elle offre l'avantage de ne constituer qu'un nombre. On devrait publier la CESO, en reconnaissant que c'est une estimation arbitraire d'un seuil d'effet qui pourrait se trouver n'importe où dans la gamme entre la CEMO et la CSEO. Cette valeur est déterminée par les concentrations choisies pour le test. On ne peut estimer aucune limite de confiance pour la CSEO, la CEMO ou la CESO.

Rapports ou procès-verbaux à produire

Le rapport d'essai doit mentionner si on s'est écarté des exigences énoncées dans les sections 2 à 6 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. Le lecteur doit pouvoir établir si les conditions et les modes opératoires ayant existé avant et pendant l'essai ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

Dans le § 7.1, nous énumérons les points (renseignements) à intégrer dans le rapport d'essai et, dans le § 7.2, les renseignements à soit intégrer dans le rapport d'essai, soit communiquer séparément dans un rapport général, soit archiver pour au moins cinq années. Certains programmes de surveillance, des protocoles d'essai connexes ou des règlements pourraient exiger de faire figurer dans le rapport d'essai certains des renseignements du § 7.2 (p. ex. des précisions sur les matières analysées ou sur les modes opératoires et les conditions explicites ayant coïncidé avec le prélèvement des échantillons, leur manutention, leur transport et leur entreposage) ou de les reléguer à l'archivage.

À l'égard de certains modes opératoires et conditions communs à une série d'essais systématiques (p. ex. les essais toxicologiques courants de surveillance ou de contrôle de la conformité au règlement) et correspondant aux exigences énoncées dans le présent document, on peut renvoyer à un rapport général ou joindre ce dernier. Dans ce rapport, on expose dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

On doit archiver, au laboratoire, pour au moins cinq ans, les détails se rapportant à la réalisation et aux constatations de l'essai, qui ne sont pas reproduits dans le rapport d'essai ni dans le rapport général, de sorte que l'on peut fournir l'information convenable si l'essai doit faire l'objet d'une vérification (audit). L'information archivée devrait comprendre les renseignements suivants :

- l'enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons prélevés sur le terrain et des autres échantillons qui ont été analysés dans un dessein de surveillance ou d'application des règlements ;
- copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons ;
- les résultats d'analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ne figurant pas dans le rapport de l'essai ;
- les notes d'observation et de mesure en laboratoire enregistrées au cours de l'essai ;
- les notes de laboratoire et les cartes de contrôle portant sur les essais toxicologiques de référence ;
- les dossiers détaillés concernant l'origine des organismes d'essai, la confirmation de leur taxonomie et tous les renseignements utiles sur leur élevage et leur état de santé ;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des appareils.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer ou parafer l'original des feuilles de données.

7.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des renseignements à intégrer dans chaque rapport.

7.1.1 Substance ou matière d'essai

- Une courte description du type d'échantillon (p. ex. déblai de dragage, sédiment de référence ou sédiment contaminé, prélevé sur le terrain, sédiment témoin) ou le code attribué à l'échantillon par le personnel du laboratoire ;
- Des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ;
- Les dates du prélèvement des échantillons ; la date et l'heure de leur réception au laboratoire.

7.1.2 Organismes utilisés

- L'espèce et l'origine des géniteurs et des organismes d'essai ;
- L'intervalle d'âge, au début de l'essai ;
- Le pourcentage de jeunes amphipodes dans les élevages d'âges connus qui sont morts ou qui ont semblé morts ou inactifs au cours des 48 h précédant immédiatement l'essai ;
- Tout aspect ou traitement inhabituel des organismes avant leur utilisation dans l'essai.

7.1.3 Installations expérimentales

- Les nom et adresse du laboratoire ;
- Le nom de la personne ou des personnes exécutant l'essai.

7.1.4 Eau d'essai

- Le type et l'origine de l'eau ;
- Les caractéristiques mesurées de l'eau, avant le début de l'essai toxicologique et au début.

7.1.5 Méthode expérimentale

- Le nom de la méthode d'essai biologique utilisée (c'est-à-dire conformément au présent document) ;
- Le plan et la description du mode opératoire, s'il est spécial (p. ex. tamisage du sédiment prélevé sur le terrain ; préparation de mélanges de sédiment enrichi ; préparation et emploi de solvant et, dans ce cas, du sédiment témoin renfermant du solvant) ou si c'est une modification de la méthode normalisée ;
- Une courte description de la fréquence des observations et des mesures effectuées au cours de l'essai et de leur type ;
- Le nom des programmes et des méthodes de calcul des paramètres de mesure statistiques.

7.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- Leur plan et leur description, si on s'écarte en tout ou en partie des modes opératoires et des conditions exposés dans le présent document.
- Le nombre d'échantillons discrets par variante ; le nombre d'enceintes (répétitions) attribué à chaque variante de l'expérience ; le nombre et la description

des variantes de chaque essai, y compris le ou les témoins ; les concentrations d'essai (s'il y a lieu) ;

- La hauteur et le volume du sédiment et de l'eau surnageante dans chaque enceinte expérimentale :
- Le nombre d'organismes par enceinte expérimentale et par variante de l'essai ;
- L'option retenue pour l'essai (c'est-à-dire renouvellement journalier de l'eau ou conditions statiques) ;
- Le régime alimentaire et les rations ;
- L'aération de l'eau surnageante (y compris son débit) ;
- Les dates du début et de la fin de l'essai.
- À l'égard de chaque échantillon, toutes les mesures de la taille granulométrique des particules de sédiment, du pourcentage d'eau, de la teneur en carbone organique total ; le pH et la teneur en ammoniaque de l'eau de porosité ;
- À l'égard d'au moins une enceinte par variante, toutes les mesures de la température et de la teneur en OD dans l'eau surnageante, au début de l'essai et au moins trois fois par semaine par la suite ; toutes les mesures de la conductivité, du pH et de la teneur en ammoniaque dans l'eau surnageante, au début et à la fin de l'essai.

7.1.7 Résultats

- À l'égard de chaque variante, la moyenne ± l'écart-type du pourcentage d'amphipodes ayant survécu à l'exposition après 14 j ; la moyenne ± l'écart-type du poids sec des amphipodes survivants à la fin de l'essai ;
- Le coefficient de variation (CV) du pourcentage moyen de survie et du poids sec individuel moyen dans les divers groupes témoins de chaque répétition, à la fin de l'essai ;
- Toute CL50 (y compris ses limites de confiance à 95 % et, si on l'a calculée, la pente) que l'on a déterminée ;
- Toute CIP (et ses limites de confiance à 95 %) déterminée pour les données sur la croissance (c'est-à-dire le poids sec à la fin de l'essai) ; des précisions concernant la transformation exigée des données l'indication de la statistique quantitative utilisée ;
- À l'égard d'un essai employant plusieurs concentrations de sédiment enrichi, l'indication selon laquelle les résultats se fondent sur des concentrations nominales ou mesurées d'une substance ou d'une matière donnée ;
- Les résultats de toute détermination de la CL50 après 96 heures (et ses limites de confiance à 95 %) au moyen du toxique ou des toxiques de référence, la moyenne géométrique (± 2 écarts-types) relative aux mêmes toxiques de référence, calculée au laboratoire à la faveur d'essais antérieurs exécutés au moyen des modes opératoires et des conditions décrits dans le présent document ;
- Toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

7.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des renseignements qu'il faut soit faire figurer dans le rapport d'essai ou dans le rapport général ou, encore, qu'il faut archiver pour au moins cinq années.

7.2.1 Substance ou matière d'essai

- Le nom des préleveurs ou des fournisseurs de l'échantillon ;
- La chaîne de transmission et les fiches d'inscription des échantillons ;
- L'état (p. ex. la température, la conservation à l'obscurité, dans un récipient scellé) de l'échantillon à sa réception et pendant son entreposage.

7.2.2 Organismes d'essai

- Le nom de la personne ayant identifié les organismes et les lignes directrices taxonomiques utilisées pour en confirmer l'espèce ;
- Les antécédents et l'âge des reproducteurs ;
- La description des conditions et des modes opératoires d'élevage de groupes d'âges mélangés et d'âge connu, notamment : installations et appareillage, éclairage, origine et qualité de l'eau, traitement préalable de l'eau, débit et méthode d'échange de l'eau, température de l'eau, âge et densité des organismes dans l'élevage, type et quantité de substrat ;
- Les méthodes utilisées pour compter, manipuler, trier, transférer et tamiser les animaux ; les méthodes utilisées pour en déterminer le taux de mortalité, l'état, l'aspect et le comportement ;
- L'origine et la composition de la nourriture, les méthodes utilisées pour la préparer et la conserver, les méthodes d'alimentation, la fréquence des repas et les rations données.

7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux

- La description de l'expérience antérieure du laboratoire dans les méthodes biologiques de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'*H. azteca* ;
- La description des systèmes d'éclairage et de fourniture de l'air comprimé ainsi que de régulation de la température dans l'installation d'essai ;
- La description des enceintes expérimentales et des couvercles, le cas échéant ;
- La description de l'appareillage utilisé pour distribuer et renouveler l'eau surnageante dans les enceintes expérimentales, si on a choisi de renouveler journellement l'eau ;
- La description des méthodes utilisées pour nettoyer ou rincer l'appareillage expérimental.

7.2.4 Sédiment témoin et eau d'essai

- Les méthodes de traitement préalable du sédiment témoin (p. ex. tamisage, sédimentation des fines particules tamisées, préparation et vieillissement du sédiment s'il est artificiel) et de l'eau d'essai (p. ex. filtration, stérilisation, reconstitution et vieillissement, si l'eau est reconstituée, réglage de la température, débit et durée d'aération).
- La nature et la quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau ;
- Les conditions et la durée d'entreposage du sédiment et de l'eau avant emploi ;

7.2.5 Méthode expérimentale

- Les modes opératoires utilisés pour le mélange ou les autres manipulations des sédiments d'essai avant leur emploi ; l'intervalle entre la préparation et l'utilisation dans les essais ;
- Le mode opératoire utilisé pour la préparation des solutions mères et/ou filles de produits chimiques ; la description et la concentration de tout solvant utilisé ;
- Les méthodes utilisées (avec citations) pour l'analyse chimique de la matière d'essai (sédiment et eau de porosité) et de l'eau d'essai, y compris des précisions concernant la prise de parties aliquotes, la préparation des prises d'essai et leur entreposage, avant l'analyse chimique ;
- L'utilisation et la description des essais préliminaires ou des essais visant à déterminer des intervalles de concentrations.

7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La mesure de l'intensité de l'éclairage au-dessus de la surface de l'eau des enceintes expérimentales ;
- Une déclaration concernant l'aération de l'eau surnageante des enceintes avant et durant l'essai ; le débit de l'aération et le mode d'aération ;
- Le compte rendu de toute interruption de l'aération des enceintes durant l'essai en conditions statiques et des dosages connexes de !'OD ;
- La description du mode opératoire et du débit de renouvellement de l'eau surnageante ;
- L'aspect de chaque échantillon ou mélange d'échantillon et de l'eau surnageante dans les enceintes ; les modifications d'aspect observées durant l'essai ;
- Les résultats de tout autre dosage (p. ex. des contaminants, des sulfures volatils acides, de la demande biochimique en oxygène, de la demande chimique en oxygène, du carbone minéral total, de la capacité d'échange cationique, du potentiel d'oxydo-réduction, du sulfure d'hydrogène de l'eau de porosité, de l'ammoniaque de l'eau de porosité) effectué avant et pendant le test sur la matière d'essai (y compris le sédiment témoin et de référence) et le contenu des enceintes ; y compris les analyses du sédiment entier, de l'eau de porosité et de l'eau surnageante ;
- Toute autre observation ou analyse faite sur la matière d'essai (y compris des échantillons du sédiment témoin ou de référence), p. ex. traces d'animaux, données qualitatives et quantitatives concernant la macrofaune indigène ou les détritus, les analyses géochimiques, etc. ;
- Les résultats des dosages de produits chimiques présent dans les solutions filles du toxique de référence.

7.2.7 Résultats de l'essai

- Les résultats de tout essai visant à déterminer un intervalle de concentrations ;
- Une carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les antécédents des essais toxicologiques au moyen du ou des toxiques de référence ;

- La représentation graphique des données ;
- L'original des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signé et daté par les membres du personnel de laboratoire effectuant les essais et les analyse connexes.

Travaux cités

ANKLEY, G.T., M.K. SCHUBAUER-BERIGAN, J.R. DIERKES, « Predicting the Toxicity of Bulk Sediments to Aquatic Organisms with Aqueous Test Fractions: Pore Water vs. Elutriate », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 1359-1366 (1991).

ANKLEY, G.T., D.A. BENOIT, R.A. HOKE, E.N. LEONARD, C.W. WEST, G.L. PHIPPS, V.R. MATTSON, L.A. ANDERSON, « Development and Evaluation of Test Methods for Benthic Invertebrates and Sediments: Effects of Flow Rate and Feeding on Water Quality and Exposure Conditions », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25*: 12-19 (1993a).

ANKLEY, G.T., V.R. MATTSON, E.N. LEONARD, C.W. WEST, J.L. BENNETT, « Predicting the Acute Toxicity of Copper in Freshwater Sediments: Evaluation of the Role of Acid-Volatile Sulfide », *Environ. Toxicol. Chem., 12*: 315-320 (1993b).

ANKLEY, G.T., D.A. BENOIT, J.C. BALOGH, T.B. REYNOLDSON, K.E. DAY, R.A. HOKE, « Evaluation of Potential Confounding Factors in Sediment Toxicity Tests with Three Freshwater Benthic Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 13:* 1791-1796 (1994).

APHA, AWWA, WEF, (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation,) « Toxicity », Part 8000, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., APHA, AWWA and WEF, Washington, DC (1995).

ARMSTRONG, F.A.J., D.P. SCOTT, « Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers », *J. Fish. Res. Board Can., 31*: 1881-1885 (1974).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates », E1383-90, p. 1-20 dans : 1991 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04, ASTM, Philadelphie, PA (1991a).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing », E1391-90, p. 1105-1119 dans : *1991 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04.* , ASTM, Philadelphie, PA (1991b).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates », E1383-93, p. 1173-1199 dans : *1993 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04.*, ASTM, Philadelphie, PA (1993).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Test Methods for Measuring the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates », E1706-95, p. 1204-1285 dans : 1995 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.05, ASTM, Philadelphie, PA (1995a).

ASTM (American Society for Testing and Materials),« Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing », E1706-95, p. 835-855 dans : *1995 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.05*, ASTM, Philadelphie, PA (1995b).

BARNARD, J.L. « Marine Fauna of New Zealand: Algal-living Littoral Gammaridea (Crustacea Ampipoda) », *Mem. New Zealand Oceanogr. Inst., 62*: 7-216 (1972).

BARNARD, J.L., C.M. BARNARD, *Freshwater Amphipoda of the World. Vols. I & II*, 830 p., 50 figs., 7 graphs, 98 maps. Hayfield Associates, Mt. Vernon, VA (1983).

BAUDO, R., J.P. GIESY, H. MUNTAU, *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-place Pollutants*, 405 p., Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI (1990).

BECKER, D.S., G.N. BIGHAM, « Field Validation of the Amphipod and Chironomid Freshwater Toxicity Tests », SETAC Platform Session #416, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX [rapport inédit] (1993).

BECKER, D.S., G.R. BILYARD, T.C. GINN, « Comparisons Between Sediment Bioassays and Alterations of Benthic Macroinvertebrate Assemblages at a Marine Superfund Site: Commencement Bay, Washington », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 669-685 (1990).

BECKER, D.S., C.D. ROSE, G.N. BIGHAM, « Comparison of the 10-day Freshwater Sediment Toxicity Tests Using *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 2089-2094 (1995).

BENOIT, D.A., G.L. PHIPPS, G.T. ANKLEY, « A Sediment Testing Intermittent Renewal System for the Automated Renewal of Overlying Water in Toxicity Tests with Contaminated Sediments », *Water Res., 27 (9)*: 1403-1412 (1993).

BORGMANN, U., « Chronic Toxicity of Ammonia to the Amphipod *Hyalella azteca*; Importance of Ammonium Ion and Water Hardness », *Environ. Pollut., 86*: 329-335 (1994).

BORGMANN, U., M. MUNAWAR, « A New Standardized Sediment Bioassay Protocol Using the Amphipod *Hyalella azteca* (Saussure) », *Hydrobiologia, 188/189*: 425-531 (1989).

BORGMANN, U., W.P. NORWOOD, « Spatial and Temporal Variability in Toxicity of Hamilton Harbour Sediments: Evaluation of the *Hyalella azteca* 4-week Chronic Toxicity Test », *J. Great Lakes Res., 19 (1)*: 72-82 (1993).

BORGMANN, U., K.M. RALPH, W.P. NORWOOD, « Toxicity Test Procedures for *Hyalella azteca*, and Chronic Toxicity of Cadmium and Pentachlorophenol to *H. azteca, Gammarus fasciatus*, and *Daphnia magna* », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18*: 756-764 (1989).

BORGMANN, U., W.P. NORWOOD, K.M. RALPH, « Chronic Toxicity and Bioaccumulation of 2,5,2',5'- and 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl and Aroclor 1242 in the Amphipod *Hyalella azteca* », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19*: 558-564 (1990).

BORGMANN, U., W.P. NORWOOD, I.M. BABIRAD, « Relationship Between Chronic Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium in *Hyalella azteca* », *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48*: 1055-1060 (1991).

BORGMANN, U., W.P. NORWOOD, C. CLARKE, « Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca* », *Hydrobiologia, 259*: 79-89 (1993).

BOROWSKY, B., « The Use of the Males' Gnathopods During Precopulation in Some Gammaridean Amphipoda », *Crustaceana, 47* (3): 245-250 (1984).

BOUSFIELD, E.L., « Fresh-water Amphipod Crustaceans of Glaciated North America », *Can. Field-Nat., 72 (2)*: 55-113 (1958).

BOUSFIELD, E.L., « Shallow-water Gammaridean Amphipoda of New England », Cornell Univ. Press, Ithaca, NY (1973).

BOUSFIELD, E.L., « A Revised Classification and Phylogeny of the Amphipod Crustacea », *Trans. Roy. Soc. Can., 4 (14)*: 343-390 (1979).

BOUSFIELD, E.L., « Amphipoda - Gammaridea », p. 245-285 dans : *Synopsis and Classification of Living Organisms*, vol. 2, S.P. Parker (coord.), McGraw-Hill, New York, NY (1982).

BOUSFIELD, E.L., « Recent Advances in the Systematics and Biogeography of Landhoppers (Amphipoda: Talitridae) of the Indo-Pacific Region », Proc. Symp. Assoc. Syst. Coll., Honolulu, mai 1982, *Bernice P. Bishop Spec. Publ. No. 72*, 171-210 (1984).

BOUSFIELD, E.L., « The Phyletic Classification of Amphipod Crustaceans - Problems in Resolution », Proc. European Crustacean Conference, Paris, septembre 1992. Présentation orale et résumé (1992).

BOUSFIELD, E.L., « A Contribution to the Reclassification of Neotropical Freshwater Hyalellid Amphipods (Crustacea: Gammaridea, Talitroidea) », *Boll. Mus. civ. St. nat. Verona, 20:* 175-224 (1996)

BOUSFIELD, E.L., C.P. STAUDE, « The Impact of J.L. Barnard on North American Pacific Amphipod Research: a Tribute », *Amphipacifica 1 (1)*: 3-17 (1994).

BROOKE, L.T., D.J. CALL, G.T. ANKLEY, D.A. BENOIT, C.W. WEST, R.A. HOKE, « A Short-Term Method for Estimating the Toxicity of Solid Phase Sediment to the Amphipod *Hyalella azteca* », 51 p., rapport préparé pour l'U.S. Environmental Protection Agency, Region 5, Chicago, Ill. (1993).

BROUWER, H., T. MURPHY, L. MCARDLE, « A Sediment-contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum* »,

Environ. Toxicol. Chem., 9: 1353-1358 (1990).

BULYCHEVA, A.I., « Morskie Blocki Morei SSSR i Sopredel'nych Vod (Amphipoda-Talitroidea) », *Akad. Nauk SSSR, Opred. po Faune SSSR 65* (1957).

BURTON, G.A. « Assessing the Toxicity of Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 1585-1627 (1991).

BURTON, G.A., Jr. (coord.) *Sediment Toxicity Assessment*, 457 p., Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI (1992).

BURTON, G.A., Jr., C.G. INGERSOLL, « Evaluating the Toxicity of Sediments », dans : *The ARCS Assessment Guidance Document* , Report EPA/905-B94/002, U.S. Environmental Protection Agency, Chicago, IL (1994).

BURTON, G.A. Jr., B.L. STEMMER, K.L. WINKS, P.E. ROSS, L.A.C. BURNETT, « A Multitrophic Level Evaluation of Sediment Toxicity in Waukegan and Indiana Harbors », *Environ. Toxicol. Chem., 8*: 1057-1066 (1989).

BURTON, G.A., Jr., T.J. NORBERG-KING, C.G. INGERSOLL, D.A. BENOIT, G.T. ANKLEY, P.V. WINGER, J. KUBITZ, J.M. LAZORCHAK, M.E. SMITH, E. GREER, F.J. DWYER, D.J. CALL, K.E. DAY, P. KENNEDY, M. STINSON, « Interlaboratory Study of Precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* Freshwater Sediment Toxicity Assays », *Environ. Toxicol. Chem., 15*: 1335-1343 (1996).

CAIRNS, M.A., A.V. NEBEKER, J.H. GAKSTATTER, W.L. GRIFFIS, « Toxicity of Copper-spiked Sediments to Freshwater Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 3*: 435-445 (1984).

CANFIELD, T.J., N.E. KEMBLE, W.G. BRUMBAUGH, F.J. DWYER, C.G. INGERSOLL, J.F. FAIRCHILD, « Use of Benthic Invertebrate Community Structure and the Sediment Quality Triad to Evaluate Metal-contaminated Sediment in the Upper Clark Fork River, MT », *Environ. Toxicol. Chem., 13*, 1999-2012 (1994).

CANO, M.L., S.D. DYER, A.J. DECARVALHO, « Effect of Sediment Organic Carbon on the Toxicity of a Surfactant to *Hyalella azteca* », *Environ. Toxicol. Chem., 15*: 1411-1417 (1996).

CCREM (Canadian Council of Resource and Environment Ministers / Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement),« Recommandations pour la qualité des eaux au Canada », Groupe de travail sur les lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, Environnement Canada, Ottawa [Ont.], (1987).

CHAPMAN, P.M., R.N. DEXTER, S.F. CROSS, D.G. MITCHELL, « A Field Trial of the Sediment Quality Triad in San Francisco Bay », NOAA Tech. Mem. NOS OMA 25, National Oceanic and Atmospheric Administration, Rockville, MD (1986).

CHAPMAN, P.M., R.N. DEXTER, E.R. LONG, « Synoptic Measures of Sediment Contamination, Toxicity and Infaunal Community Composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay », *Marine Ecol., 37*: 75-96 (1987).

CHAPMAN, P.M., E.A. POWER, R.N. DEXTER, H.B. ANDERSEN,

« Evaluation of Effects Associated with an Oil Platform, Using the Sediment Quality Triad », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 407-424 (1991).

CONLAN, K.E., « Revision of the Crustacean Amphipod Genus *Jassa* Leach (Corophioidea: Ischyroceridae) », *Can. J. Zool., 86*: 2031-2075 (1990).

CONLAN, K.E., « Precopulatory Mating Behaviour and Sexual Dimorphism in the Amphipod Crustacea », *Hydrobiologica, 223*: 255-282 (1991).

COOPER, W.E. « Dynamics and Productivity of a Natural Population of a Freshwater Amphipod », *Hyalella azteca, Ecol. Monogr., 35*: 377-394 (1965).

DAY, K.E., B.J. DUTKA, K.K. KWAN, N. BATISTA, T.B. REYNOLDSON, J.L. METCALFE-SMITH, « Correlations Between Solid-phase Microbial Screening Assays, Whole-sediment Toxicity Tests with Macroinvertebrates and *In-situ* Benthic Community Structure », *J. Great Lakes Res., 21*: 192-206 (1995a).

DAY, K.E., S. KIRBY, T.B. REYNOLDSON, « The Effect of Manipulations of Freshwater Sediments on Responses of Benthic Invertebrates in Whole-sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 1333-1343 (1995b).

de GROOT, A.J., K.H. ZSCHUPPE, « Contribution to the Standardization of the Methods of Analysis for Heavy Metals in Sediments », *Rapp. P.-v. Reun. cons. Int. Explor. Mer., 181*: 111-122 (1981).

de MARCH, B.G.E., « The Effects of Photoperiod and Temperature on the Induction and Termination of Reproductive Resting Stage in the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca* (Saussure) », *Canad. J. Zool., 55*: 1595-1600 (1977).

de MARCH, B.G.E., « The Effects of Constant and Variable Temperatures on the Size, Growth and Reproduction of the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca* (Saussure) », *Can. J. Zool., 56 (8)*: 1801-1806 (1978).

de MARCH, B.G.E., « Survival of *Hyalella azteca* (Saussure) Raised Under Different Laboratory Conditions in a pH Bioassay, with References to Copper Toxicity », *Can. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. No. 892* (1979).

de MARCH, B.G.E., « *Hyalella azteca* (Saussure) », p. 61-77 dans : *Manual for the Culture of Selected Freshwater Invertebrates*, Canad. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. No. 54, ministère des Pêches et des Océans, Ottawa [Ont.], (1981).

DFO (Department of Fisheries and Oceans, ministère des Pêches et des Océans), « Bioassay Procedures for *Hyalella azteca* », Standard Operating Procedure, U. Borgmann et W.P. Norwood, 3 p., 11 mai 1992, Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences halieutiques, Burlington (Ont.), [rapport inédit] (1992). *

Di TORO, D.M., J.H. MAHONY, D.J. HANSEN, K.J. SCOTT, M.B. HICKS, S.M. MAYR, M. REDMOND, « Toxicity of Cadmium

*. Mêmes modes opératoires que ceux de Borgmann *et al.* (1989), pour ce qui concerne l'élevage, que ceux de Borgmann *et al.* (1991), pour ce qui concerne les essais dans l'eau seulement, et que ceux de Borgmann et Norwood (1993), pour ce qui concerne les essais employant un sédiment.

in Sediments: the Role of Acid Volatile Sulfides », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 1487-1502 (1990).

Di TORO, D.M., C.S. ZARBA, D.J. HANSEN, W.J. BERRY, R.C. SWARTZ, C.E. COWAN, S.P. PAVLOU, H.E. ALLEN, N.A. THOMAS, P.R. PAQUIN, « Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic Chemicals Using Equilibrium Partitioning », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 1541-1583 (1991).

DITSWORTH, G.R., D.W. SCHULTS, J.K.P. JONES, « Preparation of Benthic Substrates for Sediment Toxicity Testing », *Environ. Toxicol. Chem., 9*: 1523-1529 (1990).

DOE, K.G., S. WADE, « Effects of Temperature and Salinity on *Amphiporeia virginiana* During Ten-day Sediment Bioassays », rapport inédit préparé par la Division des laboratoires de la Région de l'Atlantique, Environnement Canada, Canada, Dartmouth [N.-É.], (1992).

DWYER, F.J., C.J. INGERSOLL, N.E. KEMBLE, « Use of Standardized Formulated Sediment in Toxicity Tests », SETAC Platform Session #275, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX [rapport inédit] (1993).

EC (Environnement Canada), « Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence », Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/12, 91 p. (1990).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens », Conservation et Protection., Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/26, 99 p. (1992a).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia* », Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/21, 78 p. (1992b).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule », Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/22, 72 p. (1992c).

EC (Environnement Canada), « Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/29, 139 p. (1994).

EC (Environnement Canada), « Document d'orientation : sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/30, 58 p. (1995).

EC (Environnement Canada), « Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/32 (1997a).

EC (Environnement Canada), "Guidance Document on the Interpretation and Application of Data for Environmental

Toxicology", Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), Report EPS 1/RM/34 (1997b).

EC (Environnement Canada), « Recommended Procedure for Adjusting Salinity of Effluent Samples for Marine Sublethal Toxicity Testing Conducted Under Environmental Effects Monitoring (EEM Programs) », rapport inédit, juillet 1997, 5 p. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Ottawa (Ont.), (1997c)

EC (Environnement Canada), « Guidance Document on Statistical Methods to Determine Endpoints of Toxicity Tests », Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.), rapport EPS 1/RM/xx, en préparation (1997d).

EISENHART, C., M.W. HASTAY, W.A. WALLACE, *Techniques of Statistical Analysis*, chapitre 15, McGraw-Hill Book Co., New York, NY (1947).

FDA (Food and Drug Administration), « *Hyalella azteca* Acute Toxicity », Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.10, 22 p., mars 1987, préparé par C. Eirkson, M.C. Harrass, C.M. Osborne, P.G. Sayre, et M. Zeeman., Center for Food Safety and Applied Nutrition and Center for Veterinary Medicine, Washington, DC (1987).

HAMILTON, M.A., R.C. RUSSO, R.V. THURSTON, « Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays », *Environ. Sci. Technol., 11*: 714-719 (1977).

HAMR, P., R.S. KIRBY, P. GILLIS, K.E. DAY, « Development of Methodologies for Whole-sediment Toxicity Tests with Benthic Invertebrates », rapport inédit TS-27, préparé pour Environnement Canada par l'Institut national de recherche sur les eaux, Burlington [Ont.], (1994).

HARGRAVE, B.T., « The Utilization of Benthic Microflora by *Hyalella azteca* », *J. Animal Ecology, 39*: 427-437 (1970).

HOKE, R.A., P.A. KOSIAN, G.T. ANKLEY, A.M. COTTER, F.M. VANDERMEIDEN, G.L. PHIPPS, E.J. DURHAN, « Check Studies with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* in Support of the Development of a Sediment Quality Criterion for Dieldrin », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 435-443 (1995).

HUBERT, J.J., « PROBIT2: a Microcomputer Program for Probit Analysis », département de mathématiques et de statistique, univ. de Guelph, Guelph (Ont.), [rapport inédit] (1987).

INGERSOLL, C., « Desirable and Necessary Attributes for Freshwater Sediment Toxicity Tests: *Hyalella azteca* », p. 269-280 dans : *Proceedings, Tiered Testing Issues for Freshwater and Marine Sediments*, 16-18 septembre 1992, USEPA, Washington, DC (1992).

INGERSOLL, C.G., M.K. NELSON, « Testing Sediment Toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera) », p. 93-109 dans : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, W.G. Landis et W.H. van der Schalle (coord.). 13e volume, ASTM STP 1096, ASTM, Philadelphie, PA (1990).

INGERSOLL, C.G., F.J. DWYER, S.A. BURCH, M.K. NELSON, D.R. BUCKLER, J.B. HUNN, « The Use of Freshwater and Saltwater Animals to Distinguish Between the Toxic Effects of Salinity and Contaminants in Irrigation Drain Water », *Environ. Toxicol. Chem., 11*: 503-511 (1992).

INGERSOLL, C.G., G.T. ANKLEY, D.A. BENOIT, E.L. BRUNSON, G.A. BURTON, F.J. DWYER, R.A. HOKE, P.F. LANDRUM, T.J. NORBERG-KING, P.V. WINGER, « Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants Using Freshwater Invertebrates: A Review of Methods and Applications », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 1885-1894 (1995).

KEMBLE, N.E., W.G. BRUMBAUGH, E.L. BRUNSON, F.J. DWYER, C.G. INGERSOLL, D.P. MONDA, D.F. WOODWARD, « Toxicity of Metal-contaminated Sediments from the Upper Clark Fork River, MT to Aquatic Invertebrates in Laboratory Exposures », *Environ. Toxicol. Chem., 13*, 1985-1997 (1994).

KUBITZ, J.A. « Protocol for Small Volume Bioassay for *Hyalella azteca* - Survival Endpoint », Method Standard Operating Procedure Check List, Ébauche 1.0, 6 p., 9 février 1993. Institute for Environmental Toxicology, université de l'État du Michigan, East Lansing, MI [rapport inédit] (1993a).

KUBITZ, J.A. « Culture of the Amphipod *Hyalella azteca* (Saussure) », Method Standard Operating Procedure Check List, Ébauche 1.1, 8 p., 14 avril 1993. Institute for Environmental Toxicology, université de l'État du Michigan, East Lansing, MI [rapport inédit] (1993b).

KUBITZ, J.A., J.M. BESSER, J.P. GIESY, « Optimizing the Experimental Design of a Sediment Toxicity Test using the Amphipod *Hyalella azteca* », SETAC Platform Session #417, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX (1993).

KUBITZ, J.A., E.C. LEWEKE, J.M. BESSER, J.B. DRAKE III et J.P. GIESY, « Effects of Copper-contaminated Sediments on *Hyalella azteca, Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*: Survival, Growth and Enzyme Inhibition », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 29*: 97-103 (1995).

KUBITZ, J.A., J.M. BESSER, J.P. GIESY, « A Two-step Experimental Design for a Sediment Bioassay Using Growth of the Amphipod *Hyalella azteca* for the Test End Point », *Environ. Toxicol. Chem., 15*: 1783-1792 (1996).

LANDRUM, R.F., D. SCAVIA, « Influence of Sediment on Anthracene Uptake, Depuration, and Biotransformation by the Amphipod *Hyalella azteca* », *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40*: 298-305 (1983).

MCGEE, B.L., C.E. SCHLEKAT, E. REINHARZ, « Assessing Sublethal Levels of Sediment Contamination Using the Estuarine Amphipod *Leptocheirus plumulosus* », *Environ. Toxicol. Chem., 12*: 577-587 (1993).

MCLEAY, D.J., S. YEE, K. DOE, S. WADE, « Initial Evaluation by EP Laboratories of a 10-day Test for Sediment Toxicity Using the Marine Infaunal Amphipod, *Rhepoxynius abronius* », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (EP, C&P) et le GITA par McLeay

Associates Ltd., West Vancouver [C.-B.], (1989).

MCLEAY, D., S. YEE, K. DOE, S. WADE, « Phase-II and Phase-III Studies by Environment Canada Laboratories of 10-day Tests for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (EP, C&P) and IGATG by McLeay Associates Ltd., West Vancouver [C.-B.], (1991).

MCLEAY, D.J., S.G. YEE, K.G DOE, L.M. POREBSKI, « Development of 10-day Marine/Estuarine Amphipod Assay for Sediment Toxicity in Support of the Canadian Ocean Dumping Program (CEPA, Part VI) », p. 222-234 dans : *Proceedings 18th Annual Aquatic Toxicity Workshop*, 30 septembre - 3 octobre 1991, Ottawa (Ont.), Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 1863 (1992).

MCLEAY, D.J., S. YEE, K. DOE, S. WADE, A. HUYBERS, M. FENNELL, « Validation of Environment Canada's Ten-day Test for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Amphipods - Phase VI Study », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (EP, C&P) et le GITA par McLeay Associates Ltd., West Vancouver [C.-B.], (1993).

MACIOROWSKI, H.D., « Comparison of Lethality of Selected Industrial Effluents Using Various Aquatic Invertebrates Under Laboratory Conditions », *Can. Fish. Mar. Serv. Op. Dir. Tech. Rep. No. CEN/T-75-2* (1975).

MAKI, A.W., « Modifications of Continuous Flow Test Methods for Small Aquatic Organisms », *Prog. Fish. Cult., 39*: 172-174 (1977).

MASTERS, J.A., M.A. LEWIS, D.H. DAVIDSON, R.D. BRUCE, « Validation of a Four-day *Ceriodaphnia* Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 47-55 (1991).

MEARNS, A.J., R.C. SWARTZ, J.M. CUMMINS, P.A. DINNEL, P. PLESHA, P.M. CHAPMAN, « Inter-laboratory Comparison of a Sediment Toxicity Test Using the Marine Amphipod, *Rhepoxynius abronius* », *Marine Environ. Res., 19*: 13-37 (1986).

MILANI, D., K.E. DAY, D.J. MCLEAY, R.S. KIRBY, « Recent Intra- and Interlaboratory Studies Related to the Development and Standardization of Environment Canada's Biological Test Methods for Measuring Sediment Toxicity Using Freshwater Amphipods (*Hyalella azteca*) or Midge Larvae (*Chironomus riparius*), rapport technique préparé par l'Institut national de recherche sur les eaux, Burlington (Ont.), pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa [Ont.], (1996).

NEBEKER, A.V., C.E. MILLER, « Use of the Amphipod Crustacean *Hyalella azteca* in Freshwater and Estuarine Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 7*: 1027-1033 (1988).

NEBEKER, A.V., M.A. CAIRNS, J.H. GAKSTATTER, K.W. MALUEG, G.S. SCHUYTEMA, D.F. KRAWCZYK, « Biological Methods for Determining

Toxicity of Contaminated Freshwater Sediments to Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 3*: 617-630 (1984).

NEBEKER, A.V., S.T. ONJUKKA, M.A. CAIRNS, D.F. KRAWCZYK, « Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in Cadmium-Spiked Water and Sediment », *Environ. Toxicol. Chem., 5*: 933-938 (1986).

NEBEKER, A.V., G.S. SCHUYTEMA, W.L. GRIFFIS, J.A. BARBITTA, L.A. CAREY, « Effect of Sediment Organic Carbon on Survival of *Hyalella azteca* Exposed to DDT and Endrin », *Environ. Toxicol. Chem., 8*: 705-718 (1989).

NEBEKER, A.V., S.T. ONJUKKA, D.G. STEVENS, G.A. CHAPMAN, S.E. DOMINGUEZ, « Effects of Low Dissolved Oxygen on Survival, Growth and Reproduction of *Daphnia, Hyalella* and *Gammarus* », *Environ. Toxicol. Chem., 11*: 373-379 (1992).

NELSON, M.K., P.F. LANDRUM, G.A. BURTON, S.J. KLAINE, E.A. CRECELIUS, T.D. BYL, D.C. GOSSIAUX, V.N. TSYMBAL, L. CLEVELAND, C.G. INGERSOLL, G. SASSON-BRICKSON, « Toxicity of Contaminated Sediments in Dilution Series with Control Sediments », *Chemosphere, 27: 1789-1812* (1994).

NEWMAN, M.C., *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL (1955).

NORBERG-KING, T., « Development of a Standard Protocol for Testing *Hyalella azteca* », p. 361-386 dans : *Proceedings, Tiered Testing Issues for Freshwater and Marine Sediments*, 16-18 septembre 1992, USEPA, Washington, DC (1992).

NORBERG-KING, T.J., « A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: the Inhibition Concentration (ICp) Approach (Version 2.0) », U.S. Environmental Protection Agency, Environ. Res. Lab.-Duluth, Duluth, MN, Tech. Report 03-93 of National Effluent Toxicity Assessment Center (1993).

NWRI (National Water Research Institute), « Standard Operating Procedures: Culture and Sediment Bioassay Methods for *Chironomus riparius*, *Hexagenia* spp., *Hyalella azteca*, and *Tubifex tubifex* », K. Day, 30 septembre 1992, ébauche, Direction de la recherche sur les cours d'eau, Centre canadien des eaux intérieures, Environnement Canada, Burlington (Ont.), [rapport inédit] (1992).

OTHOUDT, R.A., J.P. GIESY, K.R. GRZYB, D.A. VERBRUGGE, R.A. HOKE, J.B. DRAKE, D. ANDERSON, « Evaluation of the Effects of Storage Time on the Toxicity of Sediments », *Chemosphere, 22*: 801-807 (1991).

PAINE, M.D., C.A. MCPHERSON, « Phase IV Studies of 10-day Tests for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (Division du milieu marin, EP, CP) et le GITA par EVS Consultants Ltd., North Vancouver [C.-B.], (1991a).

PAINE, M.D., C.A. MCPHERSON, « Validation of a Ten-day Test for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods - Phase V Study », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (Division du milieu marin, EP, CP) et le GITA par

EVS Consultants Ltd., North Vancouver [C.-B.], (1991b).

PASTOROK, R.A., D.C. PEEK, J.R. SAMPSON, M.A. JACOBSON, « Ecological Risk Assessment for River Sediments Contaminated by Creosote », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 1929-1941 (1994).

PHIPPS, G.L., V.R. MATTSON, G.T. ANKLEY, « The Relative Sensitivity of Three Freshwater Benthic Macroinvertebrates to Ten Contaminants », *Arch. Environ. Toxicol. Chem., 28:* 281-286 (1995).

REYNOLDSON, T.B., K.E. DAY, C. CLARKE, D. MILANI, « Effect of Indigenous Animals on Chronic End Points in Freshwater Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 973-977 (1994).

REYNOLDSON, T.B., R.C. BAILEY, K.E. DAY, R.H. NORRIS, « Biological Guidelines for Freshwater Sediment Based on BEnthic Assessment of SedimenT (the BEAST) Using a Multivariate Approach for Predicting Biological State », *Aust. J. Ecol., 20*: 198-219 (1995).

ROCCHINI, R.J., M.J.R. CLARK, A.J. JORDAN, S. HORVATH, D.J. MCLEAY, J.A. SERVIZI, A. SHOLUND, H.J. SINGLETON, R.G. WATTS, R.H. YOUNG, « *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish* », ministère de l'Environnement de la C.-B., Victoria [C.-B.], (1982).

SAS (SAS Institute Inc.), « SAS procedures guide, Release 6.03, *et* Additional SAS/STAT procedures, Release 6/03 (SAS Technical Report P-179), SAS Institute Inc., Cary, NC (1988).

SAUSSURE, H., « Mémoire sur divers crustacés nouveaux des Antilles et du Mexique », *Mém. Soc. Phys. Hist. Nat., 14 (2)*: 417-496 (1858).

SCHLEKAT, C.E., B.L. MCGEE, D.M. BOWARD, E. REINHARZ, D.J. VELINSKY, T.L. WADE, « Tidal River Sediments in the Washington, D.C. Area. III. Biological Effects Associated with Sediment Contamination », *Estuaries, 17*: 334-344 (1994).

SCHUBAUER-BERIGAN, M.K., G.T. ANKLEY, « The Contribution of Ammonia, Metals and Nonpolar Organic Compounds to the Toxicity of Sediment Interstitial Water from an Illinois River Tributary », *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 925-939 (1991).

SCHUBAUER-BERIGAN, M.K., J.R. DIERKES, P.D. MONSON, G.T. ANKLEY, « pH-Dependent Toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia, Pimephales promelas, Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus* », *Environ. Toxicol. Chem., 12*: 1261-1266 (1993).

SERGY, G., « Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection, C & P, DOE », rapport d'Environnement, Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Edmonton, AB [rapport inédit] (1987).

SIBLEY, P.K., D.G. DIXON, D.R. BARTON, « Comparison of Pore Water, Bulk Sediment, and Elutriate Toxicity Tests for Determining the Toxicity of Sediments Exposed to BKME to Benthic Macroinvertebrates », SETAC Platform Session #414, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol.*

Chem., 14-18 nov. 1993, Houston, TX (1993).

SLY, P.G., W.J. CHRISTIE, « Factors Influencing Densities and Distributions of *Pontopoereia hoyi* in Lake Ontario », *Hydrobiologia, 235/236*: 321-352 (1992).

SMITH, M.E., L.E. HERRIN, J.M. LAZORCHAK, « Methods for the Laboratory Culture of the Freshwater Amphipod, *Hyalella azteca* », rapport inédit, *12th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, Seattle, WA (1991a).

SMITH, M.E., L.E. HERRIN, D. M. MCMULLEN, J.M. LAZORCHAK, « Test Procedures for the Freshwater Amphipod, *Hyalella azteca* », rapport inédit, *12th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, Seattle, WA (1991b).

SMITH, M.E., L.E. HERRIN, S.L. BREWER, J.M. LAZORCHAK, « A Standardized Whole Sediment Exposure for *Hyalella azteca* Testing », SETAC Poster Presentation #TP6B13, *13th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 8-12 nov. 1992, Cincinnati, OH [rapport inédit] (1992a).

SMITH, M.E., L.E. HERRIN, S.L. BREWER, J.M. LAZORCHAK, « A Standard Water and Control Sediment for Toxicity Testing with *Hyalella azteca* », SETAC Poster Presentation #TP6B12, *13th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 8-12 nov. 1992, Cincinnati, OH [rapport inédit] (1992b).

SMITH, M.E., L. VIGANO, J.M. LAZORCHAK, A.M. KNEIPP, « Sediment Test Methods for a 7-day Fathead Minnow and 7-15-day Rainbow Trout Fish Embryo/Larval », SETAC Platform Session #421, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX [rapport inédit] (1993).

SOKAL, R.R., F.J. ROHLF, *Biometry*, W.H. Freement and Co., San Francisco, CA (1969).

STEEL, R.G.D., J.H. TORRIE, *Principles and Procedures of Statistics*, McGraw-Hill Book Co., New York, NY (1960).

STEPHAN, C.E., « Methods for Calculating an LC50 », p. 65-84 dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer et J.L. Hamelink (coord.), ASTM STP 634, ASTM, Philadelphie, PA (1977).

STRONG, D.R., Jr., « Life History Variation Among Populations of an Amphipod (*Hyalella azteca*) », *Ecology, 53 (6)*: 1103-1111 (1972).

SUEDEL, B.C., J.H. RODGERS Jr., « Responses of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* to Particle-size Distribution and Organic Matter Content of Formulated and Natural Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 1639-1648 (1994a).

SUEDEL, B.C., J.H. RODGERS Jr., « Development of Formulated Reference Sediments for Freshwater and Estuarine Sediment Testing », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 1163-1175 (1994b).

SUEDEL, B.C., J.H. RODGERS Jr., P.A. CLIFFORD, « Bioavailability of Fluoranthene in Freshwater Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 12*: 155-165 (1993a).

SUEDEL, B.C., E. DEAVER, J.H. RODGERS Jr., « Reducing Uncertainty in Laboratory Sediment Toxicity Tests »,

SETAC Platform Session #508, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston, TX [rapport inédit] (1993b).

SUEDEL, B.C., E. DEAVER, J.H. RODGERS, Jr., « Formulated Sediment as a Reference and Dilution Sediment in Definitive Toxicity Tests », *Arch. Envir. Contam. Toxicol., 30*: 47-52 (1996).

SUTER, G.W. II, A.E. ROSEN, E. LINDER, D.F. PARKHURST, « Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures », *Environ. Toxicol. Chem., 6*: 793-809 (1987).

SWARTZ, R.C., W.A. DEBEN, K.A. SERCU, J.O. LAMBERSON, « Sediment Toxicity and the Distribution of Amphipods in Commencement Bay, Washington, USA », *Mar. Poll. Bull., 13*: 359-364 (1982).

SWARTZ, R.C., D.W. SCHULTS, G.R. DITSWORTH, W.A. DEBEN, F.A. COLE, « Sediment Toxicity, Contamination, and Macrobenthic Communities Near a Large Sewage Outfall », p. 152-175 dans : *Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems*. T.P. Boyle, (ed). ASTM STP 865, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1985a).

SWARTZ, R.C., G.R. DITSWORTH, D.W. SCHULTS, J.O. LAMBERSON, « Sediment Toxicity to a Marine Infaunal Amphipod: Cadmium and its Interaction with Sewage Sludge », *Mar. Environ. Res., 18*: 133-153 (1985b).

SWARTZ, R.C., F.A. COLE, D.W. SCHULTS, W.A. DEBEN, « Ecological Changes in the Southern California Bight Near a Large Sewage Outfall: Benthic Conditions in 1980 and 1983 », *Marine Ecology, 31*: 1-13 (1986).

SWARTZ, R.C., P.F. KEMP, D.W. SCHULTS, J.O. LAMBERSON, « Effects of Mixtures of Sediment Contaminants on the Marine Infaunal Amphipod, *Rhepoxynius abronius* », *Environ. Toxicol. Chem., 7*: 1013-1020 (1988).

SWARTZ, R.C., F.A. COLE, J.O. LAMBERSON, S.P. FERRARO, D.W. SCHULTS, W.A. DEBEN, H. LEE, R.J. OZRETICH, « Sediment Toxicity, Contamination, and Amphipod Abundance at a DDT and Dieldrin-contaminated Site in San Francisco Bay », *Environ. Toxicol. Chem., 13*: 949-962 (1994).

TOMASOVIC, M., F.J. DWYER, I.E. GREER, C.G. INGERSOLL, « Recovery of Known-age *Hyalella azteca* (Amphipoda) from Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem., 14*: 1177-1180 (1995).

TRUSSELL, R.P. « The Percent Un-ionized Ammonia in Aqueous Ammonia Solutions at Different pH Levels and Temperatures », *J. Fish. Resh. Board Can.*, 29: 1505-1507 (1972)

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms », rapport EPA/600/4-85/013,, W.H. Peltier et C.I. Weber, (coord.), USEPA, Cincinnati, OH (1985a).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic

Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms », Report EPA/600/4-85/014, W.B. Horning et C.I. Weber (coord.), 162 p., USEPA, Cincinnati, OH (1985b).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Ambient Water Quality Criteria for Ammonia - 1984 », Report EPA 440/5-85-001, USEPA, Washington, DC (1985c)

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms », 2e éd., rapport EPA/600/4-89/001, 248 p., USEPA, Cincinnati, OH (1989).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Field and Laboratory Methods Manual, EMAP Surface Waters, Northeast Lake Pilot », D.J. Klemm et J.M. Lazorchak (coord.), rapport inédit, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati, OH (1991a).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Standard Operating Procedure for the Culture of *Hyalella azteca* », J. Denny et S. Collyard, ébauche du 25 oct. 1991, 19 p., Environmental Research Laboratory, USEPA, Duluth, MN [rapport inédit] (1991b).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms », rapport EPA-600/4-90/027, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati, OH (1991c).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms », rapport EPA-600/4-90/027F, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati, OH (1993).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates », rapport EPA 600/R-94/024, 133 p., USEPA, Duluth, MN (1994a).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (Second Edition) » Report EPA/600/4-91/003, 483 p., Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati, OH (1994b).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), « Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms », 3e éd., rapport EPA/600/4-91-002, 341 p., USEPA, Cincinnati, OH (1994c).

USEPA/USACE (United States Environmental Protection Agency/United States Army Corps of Engineers), « Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Inland and Near Coastal Waters - Testing Manual (Draft) », rapport

EPA-823-B-94-002, préparé par l'USEPA/USACE, Washington, DC (1994).

WEST, Inc., D.D. GULLEY, « Toxstat® 3.5 », Western EcoSystems Technology, Inc., Cheyenne, WY, [Logiciel et guide d'utilisation. WEST, Inc. 203, Central Ave., Cheyenne, WY 82001, USA] (1996).

WEST, C.W., V.R. MATTSON, E.N. LEONARD, G.L. PHIPPS, G.T. ANKLEY, « Comparison of the Relative Sensitivity of Three Benthic Invertebrates to Copper-contaminated Sediments from the Keweenaw Waterway », *Hydrobiologia, 262*: 57-63 (1993).

WHITEMAN, F.W., G.T. ANKLEY, M.D. KAHL, D.M. RAU, M.D. BALCER, « Evaluation of Interstitial Water as a Route of Exposure for Ammonia in Sediment Tests with Benthic Macroinvertebrates », *Environ. Toxicol. Chem., 15*: 794-801 (1996).

WILLIAMS, D.A., « A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control », *Biometrics, 27*: 103-118 (1971).

WILLIAMS, D.A. « The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control », *Biometrics, 28*: 519-532 (1972).

YEE, S., M. Van RIKXOORT, D. MCLEAY, « The Effect of Holding Time on *Eohaustorius washingtonianus* During Ten-day Sediment Bioassays and Reference Toxicant Tests », rapport inédit préparé pour Environnement Canada (EP, CP) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (GITA), 54 p., North Vancouver [C.-B.], (1992).

ZUMWALT, D.C., F.J. DWYER, I.E. GREER, C.G. INGERSOLL, « A Water-renewal System that Accurately Delivers Small Volumes of Water to Exposure Chambers », *Environ. Toxicol. Chem. 13*: 1311-1314 (1994).

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (juillet 1997)

Gouvernement fédéral (Environnement Canada)

N. Bermingham
Centre Saint-Laurent
Montréal

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal

S. Blenkinsopp
Centre de technologie environnementale
Edmonton (Alb.)

C. Boutin
Centre national de la recherche sur la faune
Hull

A. Chevrier
Division du milieu marin
Hull

A. Cook
District de Terre-Neuve
St. John's

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

K. Doe
Direction de la conservation de l'environnement
Moncton (N.-B)

G. Elliott
Laboratoire d'écotoxicologie
Edmonton (Alb.)

P. Jackman
Direction de la conservation de l'environnement
Moncton (N.-B.)

R. Kent
Direction de l'évaluation et de l'interprétation
Hull

N. Kruper
Laboratoire d'écotoxicologie
Edmonton (Alb.)

R. Legault
Centre Saint-Laurent
Montréal

D. MacGregor
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

D. Moul
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

W.R. Parker
Région de l'Atlantique
Dartmouth (N.-É.)

L. Porebski
Division du milieu marin
Hull

D. Rodrique
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

A. Steenkamer
Centre de technologie environnementale
Gloucester (Ont.)

G. van Aggelen
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

R. Watts
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

P. Wells
Région de l'Atlantique
Dartmouth (N.-É.)

W. Windle
Direction de l'évaluation des produits chimiques commerciaux
Hull

S. Yee
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

Gouvernement fédéral (Pêches et Océans Canada)
D. Cyr
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Qc)

Gouvernement fédéral (Ressources naturelles Canada)
B. McAffee
CANMET
Ottawa

Gouvernement fédéral (Commission de contrôle de l'énergie atomique)
P. Thompson
Division de la radioprotection
Ottawa

Provinces
S. Abernethy
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

C. Bastien
Ministère de l'Environnement et de la Faune
Sainte-Foy (Qc)

D. Bedard
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

J. Lee
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

M. Mueller
Environnement Ontario
Etobicoke (Ont.)

C. Neville
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

D. Poirier
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

G. Westlake
Ministère de l'Environnement et de l'Énergie
Etobicoke (Ont.)

Annexe B

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull
K1A 0H3

Région de l'Atlantique
15e étage, Queen Square
45 Alderney Drive
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
14e étage
105, rue McGill
Montréal
H2Y 2E7

Région de l'Ontario
4905, rue Dufferin, 2e étage
Downsview (Ont.)
M3H 5T4

Région de l'Ouest et du Nord
Pièce 210, Twin Atria n° 2
4999, 98e Avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon[43]
224, rue Esplanade
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7M 3H7

43. Pour le calcul de la CL50, on peut obtenir, contre une disquette formatée, un programme en BASIC de la Section de la toxicologie aquatique du Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, 2645 Dollarton Highway, North Vancouver (C.-B.) V7H 1V2.

Annexe C

Variantes des méthodes d'élevage d'*Hyalella azteca*, décrites dans les documents canadiens et américains

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent. On peut y accéder comme suit :

DFO (1989) : Borgmann et Munawar (1989) et Borgmann *et al.* (1989). Ces deux publications énoncent les modes opératoires d'élevage et d'essai alors utilisés dans le Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, du ministère des Pêches et des Océans, à Burlington (Ont.).

USFWS (1990) : Ingersoll et Nelson (1990). Cette publication énonce les modes opératoires d'élevage et d'essai alors utilisés par le National Fisheries Contaminant Research Center du Fish and Wildlife Service des États-Unis, à Columbia (MO).

ASTM (1991) : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials (à Philadelphie [PA]), pour la réalisation des essais de détermination de la toxicité des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles. Le document a été l'objet d'une nouvelle publication en 1993 (v. ASTM [1991a] et ASTM [1993], dans la bibliographie).

USEPA (1991a) : Comprend l'ébauche (avril 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage et d'essai d'*H. azteca* utilisés à l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA, à Cincinnati (OH). V. USEPA (1991a) dans la bibliographie.

USEPA (1991b) : Ébauche (25 octobre 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage d'*H. azteca* utilisés à l'Environmental Research Laboratory de l'USEPA, à Duluth (MN). V. USEPA (1991b) dans la bibliographie.

USEPA (1991c) : Présentation sommaire des méthodes d'élevage examinées par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA à Cincinnati (OH). V. Smith *et al.* (1991a) dans la bibliographie.

DFO (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédit) d'élevage et d'essai d'*H. azteca*, utilisés par U. Borgmann, du Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, du ministère des Pêches et des Océans, à Burlington. C'est le mode opératoire publié dans Borgmann et Norwood (1993). V. DFO (1992) dans la bibliographie.

NWRI (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits) d'élevage et d'essai d'*H. azteca*, utilisés par K. Day, de l'Institut national de recherche sur les eaux, de la Direction de la recherche sur les cours d'eau, du Centre canadien des eaux intérieures d'Environnement Canada à Burlington. V. NWRI (1992) dans la bibliographie.

USEPA (1992) : Norberg-King (1992), de l'Environmental Research Laboratory de l'USEPA à Duluth (MN). Résumé des modes opératoires utilisés dans 18 laboratoires américains et canadiens pour l'élevage et l'essai d'*H. azteca*.

USFWS (1992) : Ingersoll (1992), du Fish and Wildlife Service des États-Unis à Columbia (MO). Énumération des modes opératoires utilisés dans divers laboratoires pour l'élevage et l'essai d'*H. azteca*.

USEPA (1994a) : Méthodes publiées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants des sédiments, à l'aide d'invertébrés dulcicoles, par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger). V. USEPA (1994a) dans la bibliographie.

1. Origine du stock de géniteurs

Document [a]	Origine des géniteurs
DFO (1989)	rivage marécageux d'un petit lac près de Burlington (Ontario)
USFWS (1990)	n.i. [b]
ASTM (1991)	eau douce naturelle, un autre laboratoire ou origine commerciale
USEPA (1991a)	eau douce naturelle, un autre laboratoire ou origine commerciale
USEPA (1991b)	meilleure source : une baie du lac Supérieur ; sources acceptables : autres laboratoires, fournisseurs commerciaux, prélèvements locaux
USEPA (1991c)	souche Newtown de l'USEPA
DFO 1992	rivage marécageux d'un petit lac près de Burlington (Ontario)
NWRI (1992)	laboratoire du Centre canadien des eaux intérieures de Burlington (W. Norwood / U. Borgmann)
USEPA (1992)	sources diverses (riv. St. Louis, 2 labos [c] ; lac près de Burlington : 2 labos ; étang du Michigan : 1 labo ; souche Nebeker : 8 labos ; souche Newtown de l'USEPA : 4 labos)
USFWS (1992)	n.i. (sources diverses, selon le laboratoire)
USEPA (1994a)	sources diverses (éviter les populations sauvages à moins que celles-ci ne soient capables, de façon avérée, de se croiser avec des populations établies de laboratoire)

a. Voir la page précédente pour obtenir la citation exacte.
b. Non indiqué. Il s'agissait de la source Corvallis de l'USEPA, fournie par A. Nebeker.
c. Laboratoires.

2. Récipients d'élevage, volume d'eau et nombre d'amphipodes

Document	Type de récipient	Volume d'eau (L)	Nombre d'amphipodes adultes au litre
DFO (1989)	jarre de verre Pyrex de 2,5 L	1,0	5 à 25
USFWS (1990)	aquarium de verre de 80 L	50	n.i.[a]
ASTM (1991)	aquarium de 10 ou de 20 L	n.i.	n.i.
USEPA (1991a)	aquarium de 8 L	6	n.i.
USEPA (1991b)	cuve de laboratoire ou aquarium de 2 L	1	60
USEPA (1991c)	gobelet de 30 mL	0,02	100
	becher de verre de 1 L	n.i.	80
	aquarium de 8 L	6	17 à 33
	aquarium de 76 L	40	13 à 50
DFO (1992)	jarre de Pyrex de 2,5 L	1	5 à 25
NWRI (1992)	aquarium de verre de 10 L	8	20 à 25
	jarre de verre de 1,2 L	1	20 à 25
USEPA (1992)	aquarium de 1 à 39 L	0,8 à 38	n.i.
USFWS (1992)	aquarium de 1 à 100 L[b]	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	becher de verre de 2 L	1	50
	jarre de verre de 2,5 L	1	5 à 25
	aquarium de 80 L	50	n.i.

a. Non indiqué (dépend de la méthode utilisée).
b. Préférable

3. Origine, dureté et méthode de renouvellement de l'eau d'élevage

Document	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Méthode de renouvellement
DFO (1989)	rob. déchl. [a]	130 mg/L	RI [d] (une fois par semaine)
USFWS (1990)	puits	283 mg/L	RC [e] (environ 3 fois par jour)
ASTM 91991)	puits, eau de surface, rob. déchl. [b] ou reconst. [c]	facultative	RI (25 à 30 % par semaine) ou RC (100 mL/min)
USEPA (1991a)	selon l'ASTM (1991)	facultative	RC (100 mL/min) ou RI (≥ 50 %/semaine)
USEPA (1991b)	de surface ou reconst.	n.i. [f]	RI (une fois par semaine)
USEPA (1991c)	puits, diluée ou non [g]	100 mg/L 200 mg/L	RI (journellement) ou RC
DFO (1992)	rob. déchl.	130 mg/L	RI (une fois par semaine)
NWRI (1992)	rob. déchl.	n.i.	RI (30 % une fois par semaine)
USEPA (1992)	rob. déchl. (7), puits (4), de surface (3), reconst. (3)	très douce à très dure	RI ou RC
USFWS (1992)	origines diverses	douce/dure [h]	RI ou RC [h]
USEPA (1994a)	puits, de surface, reconst. [i], rob. déchl. [b], estuarienne [j]	facultative	RI ou RC [k]

a. Eau du robinet (aqueduc municipal) déchlorée.
b. On ne devrait utiliser de l'eau déchlorée qu'en dernier recours, puisque la déchloration est souvent incomplète.
c. Eau reconstituée.
d. Renouvellement intermittent.
e. Renouvellement continu.
f. Non indiqué.
g. L'eau de puits dont la dureté était de 200 mg/L a été diluée à l'eau désionisée jusqu'à la dureté de 100 mg/L.
h. Préférable
i. Une recette est fournie pour préparer une eau reconstituée convenable d'une dureté de 90 à 100 mg/L.
j. *H. azteca* a été élevé dans de l'eau salée reconstituée d'une salinité de jusqu'à 15 ‰.
k. On recommande le renouvellement de l'eau d'élevage, par l'ajout d'au moins un volume par jour. On devrait pour le moins renouveler l'eau surnageante au moins une fois par semaine, par siphonnement.

4. Température, aération et éclairage au cours de l'élevage

Document	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
DFO (1989)	25	aucune aération[a]	phot. de 16 h[a], fluoresc.[b], 55 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ [c]
USFWS 91990)	20 ± 2	débit lent (environ 2 bulles/s)	phot. de 16 h, de 269 à 538 lux
ASTM 91991)	20 ± 2	débit lent, si RI[d]	phot. de 16 h, 5 382 lux
USEPA (1991a)	25 ± 2	débit lent, si RI	phot. de 16 h, 5 382 lux
USEPA (1991b)	25	débit lent (pierre poreuse)	phot. de 16 h, 1 280 lux
USEPA (1991c)	25 (RC)[e] 23 (RI)	RI seulement	phot. de 16 h, de 538 à 1 076 lux
DFO 91992)	25	aucune aération	phot. de 16 h, fluoresc., 55 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ [c]
NWRI (1992)	23 ± 1	débit lent	phot. de 16 h, 51 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ [c]
USEPA 91992)	15 à 25[f]	n.i.[g]	n.i.
USFWS (1992)	20[h] à 25	débit modéré	phot. de 16 h, de 538 à 1 076 lux
USEPA (1994a)	23	oui, si en conditions statiques ou RI	phot. de 16 h, de 500 à 1 000 lux

a. Photopériode de 16 h.
b. Tubes fluorescents, éclairage vertical.
c. Dans le laboratoire de ces chercheurs, 1 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ = 102,5 lux. Le coefficient de conversion pourrait différer, selon le type d'éclairage.
d. Renouvellement intermittent.
e. Renouvellement continu.
f. Un laboratoire à 15 °C ; trois à 20 °C ; un à 21 ± 2 °C ; huit à 23 °C ; quatre à 25 °C.
g. Non indiqué.
h. Préférable

5. Substrats d'élevage des amphipodes

Document	Description du substrat	Quantité de substrat
DFO (1989)	plastique et gaze de coton	plusieurs découpures par jarre
USFWS (1990)	feuilles d'érable à sucre, mises préalablement à tremper 30 j, puis rincées 1 h avant emploi	n.i. [a]
ASTM (1991)	feuilles séchées d'érable, d'aulne, de bouleau ou de peuplier, préalablement mises à tremper plusieurs jours, puis rincées	n.i.
USEPA (1991a)	serviettes de papier brun déchiqueté	n.i.
USEPA (1991b)	tampons de gaze, de 10 cm sur 10, préalablement mis à tremper dans l'eau d'élevage 28 à 48 h	1 par jarre
USEPA (1991c)	une seule épaisseur de serviette de papier brun non blanchi	n.i.
DFO (1992)	pièce de gaze de 5 cm sur 10, stérile, ou pièce de 5 cm sur 10 de tissu de nylon Nitex[MC] à mailles de 210 µm	1 par jarre
NWRI (1992)	découpures de 2,5 cm sur 2,5 de Nitex[MC] à mailles de 500 µm, préalablement mises à tremper dans l'eau d'élevage 24 h	8 par aquarium, 1 par jarre
USEPA (1992)	divers (gaze, 4 labos [b] ; feuilles, 4 labos ; serviettes de papier, 2 labos ; maillage de plastique, 2 labos ; Nitex[MC], 1 labo ; Nitex[MC], sable, serviettes, 1 labo ; sédiment et serviettes, 1 labo ; plastique et feuilles, 1 labo ; filet, serviettes, 1 labo ; aucun, 1 labo	n.i.
USEPA (1992)	feuilles d'érable [c], filet de Nitex[MC], gaze de coton, toile de plastique 3-M	n.i.
USEPA (1994a)	divers (p. ex. gaze de coton, feuilles d'érable, tissé de synthèse façonné en tresse)	n.i.

a. Non indiqué.
b. Laboratoires.
c. Préférable

6. Alimentation durant la période d'élevage

Document	Description des aliments utilisés	Quantité au litre [a]	Fréquence des repas
DFO (1989)	flocons Tetra-Min[MC] pour poisson [b]	20 mg	1 à 3 fois par semaine
USFWS (1990)	feuilles d'érable à sucre, plus mélange ordinaire Tetra[MC] moulu pour poisson	n.i. [c]	à volonté
ASTM (1991)	choix de feuilles séchées d'érable, d'aulne, de bouleau ou de peuplier ; granulés pour lapin ; feuilles de céréales moulues ; granulés d'aliment pour poisson ; artémias ; *Daphnia* tués par la chaleur ; algues vertes et épinards	n.i.	n.i.
USEPA (1991a)	flocons d'aliment pour poisson Tetra-Min et artémias	3,3 mg	1 fois par jour
USEPA (1991b)	succès plus grand si on utilise des algues filamenteuses et l'aliment LCT [d] ; diatomées cultivées (*Synedra*), comme solution de rechange	10 mL de LCT une pincée d'algues	3 fois par semaine 1 fois par semaine
USEPA (1991c)	flocons moulus d'aliment pour poisson plus algues séchées (*Spirulina* sp.)	50 à 167 mg	2 fois par jour
DFO (1992)	flocons d'aliment pour poisson Tetra-Min[MC] [b]	10 mg	1 à 3 fois par semaine
NWRI (1992)	flocons d'aliment pour poisson Nutrafin[MC] [b]	2 ou 4 gouttes [e]	2 fois par semaine
USEPA (1992)	divers aliments (un seul type d'aliment, 7 labos ; plusieurs types, 11 labos) [f]	diverse	diverse [g]
USFWS (1992)	feuilles d'érable [h], Tetra-Min[MC], nourriture pour lapin, diatomées	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	divers aliments (p. ex. LCT plus algues ; Tetra-Min[MC])	diverse	diverse

a. Quantité de nourriture ajoutée par litre d'eau d'élevage.
b. On a moulu les flocons et on les a passés au travers d'un tamis de nylon à ouvertures de 500 µm.
c. Non indiqué.
d. Levures, Cerophyll[MC], et nourriture pour truite (régime de l'USEPA pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia*).
e. Deux gouttes d'une suspension de 100 mg de Nutrafin par mL, ajoutées dans chaque jarre ; quatre gouttes dans chaque aquarium.
f. Comprennent diverses rations de levure, de Cerophyll[MC], d'algues, de diatomées, de blé en herbe, de luzerne, de Tetra-Min, de Nutrafin, de LCT, de granulés pour lapin, de feuilles et de morceaux de serviettes de papier.
g. Pour les élevages dont on remplace l'eau de façon intermittente, la fréquence des repas a varié d'une fois par mois à deux fois par jour (47 % des labos donnent deux repas par semaine) ; dans les élevages à renouvellement continu de l'eau, la fréquence des repas varie d'une fois par semaine à une fois par jour.
h. Préférable

7. Prélèvement des jeunes destinés aux essais

Document	Mode opératoire	Fréquence	Nombre de jeunes au litre [a]
DFO (1989)	secouer le substrat ; filtrer au travers d'un tamis à mailles de 275 µm, recueillir dans une boîte de Petri ; rincer et trier [b]	une fois par semaine	n.i. [c]
USFWS (1990)	par rinçage, détacher des feuilles une partie des sujets d'âges mélangés ; filtrer sur tamis à mailles de 425 µm, de façon à obtenir des sujets d'au plus 3 mm de longueur ; conserver durant la nuit dans un becher de 1 L, en eau aérée	n.i.	n.i.
ASTM (1991)	par rinçage, détacher des feuilles une partie des sujets d'âges mélangés ; filtrer sur tamis à mailles de 250 µm (dans le cas des jeunes) à 425 µm (dans le cas des adultes) ; conserver les jeunes au plus 24 h dans des bechers	n.i.	n.i.
USEPA (1991a)	obtenir à partir d'adultes [d] ou tamiser journellement	une fois par jour	n.i.
USEPA (1991b)	verser le contenu de la jarre dans une cuvette peu profonde ; rincer doucement et détacher les animaux du substrat ; compter et retourner les adultes dans la jarre ; compter les jeunes et les utiliser ou les élever encore 7 j	une fois par semaine	n.i.
USEPA (1991c)	tamiser les jeunes issus des couples d'adultes	3 fois par semaine	33 à 120 [e]
DFO (1992)	conformément à Borgmann et Munawar (1989)	une fois par semaine	5 à 25
NWRI (1992)	passer le contenu de la jarre au tamis à mailles de 363 µm et recueillir par rinçage les sujets dans une boîte de Petri ; séparer les jeunes au moyen d'une pipette ; compter les adultes ; compter les jeunes et les conserver	une fois par semaine	20 à 35
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	divers modes opératoires, pour obtenir les amphipodes âgés de 7 à 14 j	variable	variable

a. Nombre estimatif de jeunes prélevés par litre d'eau d'élevage.
b. Séparés, les jeunes sont conservés 2 j dans des jarres renfermant un litre d'eau, une pièce de gaze de 5 cm sur 10 et 20 mg de Tetra-Min^MC, avant de servir aux dosages biologiques. Par ce repos, on veut assurer leur survie et déterminer le nombre de jeunes disponibles.
c. Non indiqué.
d. Les couples d'adultes sont logés dans des bechers de 1 L, à raison de 25 couples par becher, puis on les nourrit. Après 24 h, on recueille les jeunes libérés.
e. Un becher de 1 L, avec renouvellement journalier de la nourriture et de l'eau, peut donner 120 jeunes par jour.

Annexe D

Variantes du mode opératoire des essais de mesure de la toxicité des sédiments à l'aide d'*Hyalella azteca*, décrites dans les documents canadiens et américains

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent. On peut y accéder comme suit :

DFO (1989) : Borgmann et Munawar (1989) et Borgmann *et al.* (1989). Ces deux publications énoncent les modes opératoires d'élevage et d'essai alors utilisés dans le Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, du ministère des Pêches et des Océans, à Burlington (Ont.).

USFWS (1990) : Ingersoll et Nelson (1990). Cette publication énonce les modes opératoires d'élevage et d'essai alors utilisés par le National Fisheries Contaminant Research Center du Fish and Wildlife Service des États-Unis, à Columbia (MO).

ASTM (1991) : Norme (alors en vigueur) publiée par l'American Society for Testing and Materials (à Philadelphie [PA]), pour la réalisation des essais de détermination de la toxicité des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles. Le document a été l'objet d'une nouvelle publication en 1993 (v. ASTM [1991a] et ASTM [1993], dans la bibliographie).

USEPA (1991a) : Comprend l'ébauche (avril 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage et d'essai d'*H. azteca* utilisés à l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA, à Cincinnati (OH). V. USEPA (1991a) dans la bibliographie.

USEPA (1991b) : Présentation sommaire des méthodes d'essai utilisées par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA à Cincinnati (OH). V. Smith *et al.* (1991b) dans la bibliographie.

DFO (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits) d'élevage et d'essai d'*H. azteca*, utilisés par U. Borgmann, du Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, du ministère des Pêches et des Océans, à Burlington. C'est le mode opératoire publié dans Borgmann et Norwood (1993). V. DFO (1992) dans la bibliographie.

NWRI (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits) d'élevage et d'essai d'*H. azteca*, utilisés par K. Day, de l'Institut national de recherche sur les eaux, de la Direction de la recherche sur les cours d'eau, du Centre canadien des eaux intérieures d'Environnement Canada à Burlington. V. NWRI (1992) dans la bibliographie.

USEPA (1992) : Norberg-King (1992), de l'Environmental Research Laboratory de l'USEPA à Duluth (MN). Résumé des modes opératoires utilisés dans 18 laboratoires américains et canadiens pour l'élevage et l'essai d'*H. azteca*.

USFWS (1992) : Ingersoll (1992), du Fish and Wildlife Service des États-Unis à Columbia (MO). Énumération des modes opératoires utilisés dans divers laboratoires pour l'élevage et l'essai d'*H. azteca*.

USEPA (1994a) : Méthodes publiées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants des sédiments, à l'aide d'invertébrés dulcicoles, par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger). V. USEPA (1994a) dans la bibliographie.

1. Type d'essai, âge et taille des sujets, type de récipient, nombre d'amphipodes par récipient, nombre de répétitions par variante et durée de l'essai

Document[a]	Type d'essai	Âge et taille des sujets	Récipient	Nombre de sujets par récipient	Nombre de répétitions	Durée de l'essai (jours)
DFO (1989)	c. stat.[b]	jusqu'à 7 j	jarre de 2,5 L	20	n.i.[c]	28
USFWS (1990)	c. stat.	≤ 3 mm[e]	b. 1 L[g]	20	4	29
	RC[d]	≤ 3 mm	b. 1 L	20	4	29
ASTM (1991)	c. stat.	2 à 3 mm[f]	b. 1 L	20	4	≤ 10 à 30
	c. stat.	2 à 3 mm	aquar. 20 L	100	≥ 2	≤ 10 à 30
	RC	2 à 3 mm	b. 1 L	20	4	≤ 10 à 30
USEPA (1991a)	RI[h]	2 ± 1 j	600 mL	20	4	7
USEPA (1991b)	RI	2 ± 1 j	600 mL	20	4	7
DFO (1992)	c. stat.	jusqu'à 7 j	b. 250 mL	20	4	28
NWRI (1992)	c. stat.[b]	1 à 10 j	b. 250 mL	15	5	28
USEPA (1992)	c. stat.[i]	variable[j]	n.i.	n.i.	n.i.	10 à 28[k]
USFWS (1992)	RC[l]	7 à 14 j[m]	1 L[n]	20	4 ou 5	7 à 28[o]
USEPA (1994a)	RI ou RC[p]	7 à 14 j	300 mL	10	8[q]	10

a. Voir la page précédente pour obtenir la citation exacte.
b. Conditions statiques. Ajout d'eau distillée, au besoin, pour maintenir constant le niveau de l'eau.
c. Non indiqué.
d. Renouvellement continu.
e. Vers le troisième stade de développement.
f. Jeune sujet, du deuxième ou troisième stade.
g. Becher.
h. Renouvellement intermittent.
i. Dans 10 des 12 laboratoires, l'eau n'est pas remplacée, les deux autres complètent le volume. Dans 9 des 18 laboratoires, on a effectué des essais au cours desquels on a renouvelé l'eau à des fréquences allant d'une fois à toutes les quatre à six heures à deux fois par semaine.
j. 7 labos, âge connu ; 8 labos, tamisage en fonction de la taille ou de l'âge ; 2 labos, âges mélangés ; 1 labo, âge ou taille inconnus.
k. Huit labos, 10 j ; un labo, 10 à 14 j ; quatre labos, 14 j ; un labo, 20 j ; quatre labos, 28 j.
l. Également en conditions statiques ou avec renouvellement intermittent
m. On préfère des âges mélangés (7 à 14 j) ; également âge connu (0 à 7 j ou 7 à 14 j).
n. Préférable ; peut varier de 25 mL à 100 L.
o. Préférable : 10 j.
p. Deux fois le volume par jour, par renouvellement intermittent ou continu.
q. Selon l'objectif de l'essai. Huit répétitions recommandées pour les essais courants.

2. Récipients et milieux servant aux essais.

Document	Récipient	Couvercle	Quantité de sédiment	Quantité d'eau
DFO (1989)	jarre de Pyrex de 2,5 L, à couvercle vissant	feuille de Plexiglas	1 à 1,5 cm d'épaisseur	n.i.[a, b]
USFWS (1990)	becher de verre de 1 L	verre de montre	200 mL	800 mL
ASTM (1991)	becher de verre de 1 L aquarium de 20 L	verre de montre n.i.	200 mL 2 à 3 cm d'épaisseur	800 mL 15 cm d'épaisseur
USEPA (1991a)	600 mL	verre de montre ou feuille de verre ou de plastique	100 mL	400 mL
USEPA (1991b)	600 mL	n.i.	100 mL	400 mL
DFO (1992)	becher de 250 mL	boîte de Petri de plastique[c]	40 mL[d]	160 mL[d]
NWRI (1992)	becher de 250 mL	boîte de Petri[e]	50 mL	200 mL
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	1 L[f]	n.i.	n.i.[g]	n.i.[g]
USEPA (1994a)	becher de 300 mL, de forme haute, sans bec	n.i.	100 mL	175 mL

a. n.i. : non indiqué.
b. Volume total (sédiment plus eau de mer) : 1,5 L.
c. Entaille, pour l'aération.
d. Le sédiment est versé dans le becher après l'adjonction de l'eau.
e. Orifice percé pour le passage d'une conduite d'aération.
f. Volume préférable. Peut varier de 25 mL à 100 L.
g. Le rapport du volume d'eau au volume de sédiment peut varier de 4/1 (préférable) à 1/1.

3. Origine et dureté de l'eau, méthode de renouvellement de l'eau au cours de l'essai

Document	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Méthode de renouvellement
DFO (1989)	eau du robinet déchlorée[a]	130 mg/L	conditions statiques, avec adjonction pour maintenir le niveau constant[b]
USFWS (1990)	reconstituée[c]	134 mg/L	conditions statiques, renouvellement continu[d,e]
ASTM (1991)	eau de puits, de surface, déchlorée du robinet ou reconstituée	facultative	conditions statiques ou renouvellement continu
USEPA (1991a)	eau de puits diluée[f]	90 à 110 mg/L	RI[g]
USEPA (1991b)	eau de puits diluée[f]	100 mg/L	RI, journellement
DFO (1992)	eau du robinet déchlorée[a]	130 mg/L	conditions statiques[h]
NWRI (1992)	eau du robinet déchlorée[a]	n.i.[i]	conditions statiques[j]
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	conditions statiques ou renouvellement de l'eau[k]
USFWS (1992)	n.i.	douce, dure[l]	conditions statiques, RI, RC[l]
USEPA (1994a)	eau d'élevage, eau de puits, eau de surface, eau prélevée sur place ou eau reconstituée[m]	facultative	RI ou RC, 2 fois par jour[n]

a. Même origine et même dureté que celles de l'eau ayant servi à l'élevage des amphipodes.
b. Adjonction d'eau distillée, au besoin, pour maintenir le niveau constant.
c. On a utilisé une eau de puits d'une dureté de 283 mg/L pour l'élevage des amphipodes ; au cours de l'essai, on a utilisé de l'eau reconstituée.
d. Renouvellement continu.
e. 3,8 fois le volume du becher par jour.
f. À l'aide d'eau désionisée, on a dilué l'eau de puits d'une dureté de 200 mg/L pour que cette dernière soit de 100 mg/L.
g. Renouvellement intermittent.
h. On devrait remplacer hebdomadairement l'eau des milieux témoins uniquement.
i. Non indiqué.
j. Les pertes par évaporation sont compensées hebdomadairement par de l'eau distillée.
k. Sur les 18 laboratoires sondés, 10 fonctionnaient en conditions statiques, sans renouvellement de l'eau, 2 en conditions statiques avec maintien du niveau ; 9 ont également renouvelé l'eau surnageante à une fréquence variant d'une fois à toutes les quatre à six heures à deux fois par semaine.
l. Préférable
m. Une recette est fournie pour préparer une eau reconstituée convenable, dont la dureté varie de 90 à 100 mg de $CaCO_3$/L.
n. Chaque enceinte expérimentale devrait recevoir deux fois son volume d'eau surnageante par jour, de façon intermittente (adjonction manuelle ou automatisée) ou par renouvellement continu.

4. Température, aération et éclairage au cours de l'essai

Document	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
DFO (1989)	21 ± 1	débit lent, au moyen de pierre poreuse suspendue à plusieurs centimètres au-dessus du sédiment	phot. de 16 h [a], fluoresc. [b] 55 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
USFWS (1990)	20 ± 1	débit lent (environ 2 bulles/s)	phot. de 16 h, 269 à 538 lux
ASTM (1991)	20 à 25	débit lent	phot. de 16 h, 538 lux
USEPA (1991a)	25 ± 1	débit lent	phot. de 16 h, 538 lux
USEPA (1991b)	25 ± 1	aucune aération	n.i.
DFO (1992)	25	débit lent, au moyen d'une pipette de verre jetable dont l'extrémité se trouve à une profondeur médiane au sein de l'eau	phot. de 16 h, fluoresc.
NWRI (1992)	23 ± 1	débit lent	phot. de 16 h
USEPA (1992)	20 à 25 [c]	n.i. [d]	n.i.
USFWS (1992)	20 à 25 [e]	aération nulle ou modérée [f]	phot. de 16 h, 269 à 538 lux
USEPA (1994a)	23 ± 1 [g]	normalement aucune [h]	phot. de 16 h, ~ 500 à 1 000 lux, fluorescents en spectre large

a. Photopériode de 16 h.
b. Tubes fluorescents, pour éclairage vertical.
c. Sept laboratoires à 20 °C, un à 20-25 °C, quatre à 23 °C et cinq à 25 °C.
d. Non indiqué.
e. Préférence : 20 °C.
f. Aucune préférence
g. La température moyenne journalière doit être de 23 ± 1 °C ; la température instantanée doit toujours être de 23 ± 3 °C.
h. Aérer si la teneur en OD dans l'eau surnageante chute sous 40 % du taux de saturation.

5. Alimentation au cours de l'essai

Document	Description des aliments	Quantité par récipient	Fréquence des repas
DFO (1989)	flocons[a] d'aliment pour poisson Tetra-Min[MC]	20 mg	1 à 3 fois par semaine
USFWS (1990)	granulés pour lapin Purina[MC]	14 ou 20 mg[b]	3 fois par semaine
ASTM (1991)	granulés pour lapin[c]	variable[b,d]	2 ou 3 fois par semaine
USEPA (1991a)	flocons moulus d'aliment pour poisson Tetra-Min	14 mg	3 fois par semaine
USEPA (1991b)	flocons d'aliments mélangés pour poisson	1 mL	aux jours 0, 2, 4 et 6
DFO (1992)	flocons[a] d'aliment pour poisson Tetra-Min[MC]	5 mg	3 fois par semaine
NWRI (1992)	flocons[a] d'aliment pour poisson Nutrafin[MC]	8 mg[e]	2 fois par semaine
USEPA (1992)	n.i.[f]	n.i.	variée[g]
USFWS (1992)	variable[h]	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	LCT[i]	1,5 mL	quotidienne

a. Flocons moulus, puis passés au tamis de nylon à mailles de 500 µm.
b. Pour les essais en conditions statiques, 14 mg par becher ; pour les essais avec renouvellement continu de l'eau, 20 mg par becher.
c. Il faudrait moudre les granulés, les disperser dans de l'eau désionisée et les remettre en suspension quand on en prélève des parties aliquotes.
d. On peut, notamment, donner 6 mg de granulés trois fois par semaine au cours de la première semaine et 12 mg par repas par la suite.
e. Ajouter sous la forme d'une suspension de Nutrafin moulu, préparée par ajout de 1 g de flocons à 100 mL d'eau distillée, puis pulvérisation. Un volume d'environ 604 µL équivaut à 8 mg.
f. Non indiqué.
g. Sur 16 laboratoires sondés, cinq ont donné 7 repas par semaine au cours des essais ; cinq, 3 repas par semaine ; deux, 2 repas par semaine ; un, 1 repas par semaine ; un, 1 repas à toutes les 48 h ; un, 1 repas au début de l'essai seulement ; un n'a donné aucun repas au cours de l'essai.
h. Aucune nourriture ; nourriture pour lapin ; levure, Cerophyll[MC] et nourriture pour truite (LCT) ; feuilles d'érable ; Tetra-Min.
i. Levures, Cerophyll[MC] et nourriture pour truite.

6. Surveillance de la qualité de l'eau surnageante au cours de l'essai

Document	Variables surveillées [a]	Fréquence
DFO (1989)	n.i. [b]	n.i.
USFWS (1990)	OD, pH, alc., dur., conduct.	au moins à tous les 10 j, chaque variante de l'expérience [c]
ASTM (1991)	OD	au début, à la fin et au moins à toutes les semaines [d, e]
	pH, alc., dur., conduct.	au début, à la fin et au moins à toutes les semaines [d]
	temp.	chaque jour [d, f]
USEPA (1991a)	OD, pH, alc., dur., conduct., temp.	au début et à la fin
USEPA (1991b)	n.i.	n.i.
DFO (1992)	OD, pH	au début et au moins à toutes les semaines [c]
	ammoniaque	au début (facultatif, mais souhaitable)
NWRI (1992)	OD, pH, conduct., temp.	aux jours 0, 14 et 28
USEPA (1992)	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	OD [g]	chaque jour
	pH [g], alc., dur., conduct., ammoniaque	au début et à la fin [h]
	temp.	chaque jour [d, f]

a. **alc.** : alcalinité totale ; **conduct.** : conductivité spécifique ; **dur.** : dureté totale ; **OD** : oxygène dissous ; **pH** : concentration des ions hydrogène ; **temp.** : température.
b. Non indiqué.
c. Pour les mesures, on a prélevé 50 mL de l'eau surnageante. Dans les conditions statiques, on a remplacé ce prélèvement par de l'eau fraîche, dont la température avait été ajustée.
d. Mesuré dans au moins une enceinte expérimentale, représentative de chaque variante de l'expérience.
e. Dosage de l'OD obligatoire si on observe l'interruption de l'aération (en conditions statiques) ou du renouvellement de l'eau (renouvellement continu) et chaque fois que le comportement des sujets montre que la concentration d'OD est trop faible (p. ex. si on observe que les amphipodes sont sortis du sédiment).
f. La température moyenne journalière doit se situer à ± 1 °C de la température souhaitée ; la température instantanée doit se trouver à ± 3 °C de cette température.
g. On peut le doser directement au moyen d'une sonde.
h. On devrait prélever de l'eau surnageante immédiatement avant le renouvellement de l'eau, à environ 1 à 2 cm au-dessus du sédiment, à l'aide d'une pipette. Les valeurs ne devraient pas varier de plus de 50 % au cours d'un essai.

7. Conditions d'entreposage et caractérisation du sédiment utilisé pour l'essai

Document	Conditions d'entreposage	Caractéristiques mesurées [a]
DFO (1989)	au réfrigérateur, dans des sacs de plastique	n.i. [b]
USFWS (1990)	à 4 °C dans des sacs de Téflon^{MC}, dans les 24 h ; à utiliser dans les deux semaines	COT, CI, % d'eau, SLA, M, BPC, AP
ASTM (1991)	4 ± 2 °C pendant au plus deux semaines [c]	au moins le pH, COT, % d'eau, SLA ; pourraient s'y ajouter : DBO, DCO, CI, MVT, SVA, Eh, HG, OS, AT, M, AP, H_2O_p
USEPA (1991a)	4 °C pendant au plus deux semaines	n.i.
USEPA (1991b)	n.i.	n.i.
DFO (1992)	n.i.	% d'eau, MVT, MV
NWRI (1992)	dans de petits seaux de plastique scellés, à 4 °C ; à utiliser dans les six semaines	n.i.
USEPA (1992)	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	4 °C [d]	au moins le pH et la teneur en ammoniaque totale de l'eau de porosité ainsi que : COT, % d'eau, SLA ; pourraient s'y ajouter les paramètres suivants : DBO, CDO, CEC, CI, MVT, SLA, Eh, HG, COS, M, AP, H_2O_p

a. **AP** : aromatiques polycycliques ; **AT** : ammoniaque totale ; **BPC** : biphényles polychlorés totaux ; **CEC** : capacité d'échange cationique ; **CI** : carbone inorganique ; **COS** : composés organiques de synthèse ; **COT** : carbone organique total ; **DBO** : demande biochimique en oxygène ; **DCO** : demande chimique en oxygène ; **Eh** : potentiel d'oxydo-réduction ; **H_2O_p** : eau de porosité ; **HG** : huiles et graisses ; **M** : métaux (p. ex. As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) ; **MV** : masse volumique (g/mL) ; **MVT** : matières volatiles totales ; **OS** : organosiliciés ; **pH** : concentration des ions hydrogène ; **SLA** : % de sable, de limon et d'argile ; **SVA** : sulfures volatils acides.

b. Non indiqué.

c. S'il est conservé plus de deux semaines, le sédiment devrait être soumis à de nouveaux essais pour confirmer la constance de sa toxicité.

d. Entreprendre l'essai toxicologique le plus tôt possible après le prélèvement de l'échantillon. S'il débute après deux semaines après le prélèvement, des caractérisations supplémentaires du sédiment sont souhaitables pour évaluer les effets possibles de l'entreposage.

8. Manipulation du sédiment avant l'essai

Document	Manipulation du sédiment
DFO (1989)	passer au tamis de nylon à mailles de 275 µm, en se servant de l'eau surnageante des jarres utilisées dans l'expérience (tamisage hydraulique) ; laisser reposer plusieurs jours avant d'y admettre les amphipodes.
USFWS (1990)	mélanger dans le récipient d'entreposage ; lisser une partie aliquote à la cuillère de Téflon[MC] dans le becher d'essai ; verser graduellement de l'eau surnageante, le long de la paroi du becher ; laisser reposer pendant la nuit avant l'admission des amphipodes.
ASTM (1991)	mélanger à fond ; tamisage hydraulique autorisé pour éliminer les grosses particules et les organismes indigènes ; on peut diluer et mêler avec un volume égal d'eau surnageante pour faciliter le tamisage ; lisser la couche de sédiment dans l'enceinte expérimentale ; verser l'eau surnageante le long de la paroi du becher, laisser reposer au cours de la nuit avant d'admettre les amphipodes.
USEPA (1991a)	mélanger l'échantillon ; lisser une partie aliquote, pour former une couche dans l'enceinte expérimentale ; verser doucement l'eau surnageante le long de la paroi du becher ; laisser reposer au cours de la nuit avant d'admettre les amphipodes.
USEPA (1991b)	n.i.
DFO (1992)	mélanger l'échantillon ou prélever des parties aliquotes en plusieurs endroits ; à l'aide d'une cuillère d'acier inoxydable, transvaser la partie aliquote dans le becher renfermant déjà de l'eau ; aérer vigoureusement l'eau surnageante pendant 24 h ; réduire l'aération à un débit lent et laisser le sédiment se déposer encore 24 h.
NWRI (1992)	passer au travers d'un tamis à ouvertures de 250 µm, en utilisant une partie de l'eau surnageante pour l'essai ; rejeter le refus du tamis et laisser le sédiment tamisé et l'eau surnageante reposer au cours de la nuit ; décanter l'eau surnageante pour l'utiliser dans l'essai ; ajouter le sédiment dans des bechers servant à la répétition d'expérience puis l'eau surnageante ; laisser reposer 24 h et aérer au moins une heure avant d'admettre les amphipodes[a]
USEPA (1992)	n.i.[b]
USFWS (1992)	n.i.
USEPA (1994a)	mélanger, y compris toute eau s'étant séparée ; ne pas tamiser les échantillons[c] ; retirer les gros organismes et les gros débris au moyen de pincettes.

a. Dans certains cas, on congèle le sédiment tamisé pendant 24 h et on le fait dégeler, afin de tuer tous les œufs résiduels de tubifex.
b. Non indiqué.
c. S'il faut tamiser le sédiment, il faudrait prélever des échantillons avant et après le tamisage (p. ex. métaux présents dans l'eau de porosité) pour élucider l'influence du tamisage sur les propriétés chimiques du sédiment.

9. Fin de l'essai et paramètres de mesure biologiques

Document	Fin de l'essai	Paramètres de mesure biologiques
DFO (1989)	passer le contenu de la jarre au tamis à mailles de 275 µm ; trier, compter et peser les survivants	% moyen de survie, poids humide moyen
USFWS (1990)	tamiser le sédiment par voie humide ; conserver les sujets dans une solution de sucre et de formaldéhyde pour les mesures ultérieures de la longueur [a]	% de survie, longueur du corps (mm)
ASTM (1991)	au moyen d'une pipette, prélever les animaux survivants présents dans l'eau ; passer le sédiment au tamis à mailles de 500 µm ; compter les sujets vivants et les cadavres ; mesurer leur longueur [b]	% moyen de survie, longueur moyenne du corps, poids moyen, maturation
USEPA (1991a)	passer le contenu du becher au tamis à mailles de 500 µm ; rincer les animaux arrêtés par le tamis ; compter les sujets vivants et les cadavres ; mesurer le poids sec moyen [b]	% moyen de survie, poids sec moyen
USEPA (1991b)	n.i.	% moyen de survie, poids sec moyen
DFO (1992)	passer le contenu de la jarre au tamis à mailles de 275 µm ; trier, compter et peser les survivants	% moyen de survie, poids frais moyen
NWRI (1992)	passer le contenu du becher au tamis à mailles de 500 µm ; compter et peser les amphipodes survivants	% moyen de survie, poids sec moyen [c]
USEPA (1992)	n.i. [d]	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	% de survie, maturation staturo-pondérale
USEPA (1994a)	à l'aide d'une pipette prélever les amphipodes présents dans l'eau ou à la surface des sédiments ; passer le sédiment au tamis à mailles de 710 µm ou au travers de nombreux tamis ; compter les survivants et mesurer la croissance [e]	% moyen de survie, longueur ou poids [e]

a. On présume que les animaux non retrouvés sont morts et se sont désintégrés.
b. On peut utiliser des tamis de taille supplémentaire. On peut préserver les animaux pour les déterminations ultérieures de la longueur ou du poids.
c. On met les survivants de chaque becher à sécher pendant 24 h à 60 °C, puis on les pèse collectivement.
d. Non indiqué.
e. On peut préserver les survivants dans une solution à 8 % de sucre et de formaldéhyde en vue d'en mesurer la croissance (c'est-à-dire de la longueur du corps). Si on détermine le poids sec, réunir les survivants et les faire sécher à 60 à 90 °C, jusqu'à obtention d'un poids constant, ramener à la température ambiante et peser au centième de milligramme près. La mesure de la croissance est facultative.

10. Utilisation de sédiments témoins de référence et exigences relatives à la validité de l'essai

Document	Sédiment témoin ou de référence	Condition de validité de l'essai
DFO (1989)	aucun utilisé [a]	n.i. [b]
USFWS (1990)	sédiment témoin fin	n.i.
ASTM (1991)	chaque essai exige un sédiment témoin négatif (non contaminé) ou un sédiment de référence non contaminé [c]	taux moyen de survie d'au moins 80 % [d]
USEPA (1991a)	chaque essai exige un sédiment témoin négatif (non contaminé) ou un sédiment de référence non contaminé [c]	taux moyen de survie d'au moins 80 % [d] ; taux de survie dans un récipient : > 70 % [d]
USEPA (1991)	sédiment témoin négatif	n.i.
DFO (1992)	aucun utilisé [a, e]	n.i.
NWRI (1992)	sédiments de référence et témoin négatifs	taux moyen de survie d'au moins 80 % [d]
USEPA (1992)	sédiment témoin négatif	taux moyen de survie : 60 à 90 % [f]
USFWS (1992)	sédiment témoin négatif	taux moyen de survie d'au moins 80 % [d]
USEPA (1994a)	sédiments de référence et témoin négatifs	taux moyen de survie d'au moins 80 % [d]

a. Le taux de survie et le taux de croissance des témoins ont été mesurés dans une enceinte où le substrat était de la gaze (pas de sédiment).

b. Non indiqué.

c. On devrait prélever un sédiment de référence sur le terrain, dans un endroit non contaminé ; il devrait être représentatif du sédiment d'essai par ses caractéristiques (p. ex. granulométrie, teneur en carbone organique total, pH).

d. L'essai est inacceptable si le taux moyen de survie des organismes dans un récipient renfermant le sédiment témoin négatif est inférieur à 80 %.

e. On a remplacé à toutes les semaines l'eau des récipients témoins (mais non des bechers renfermant du sédiment).

f. Treize laboratoires fixent à 80 % de survie dans le milieu témoin le seuil de validité de l'essai ; deux, le fixent à 70 % ; un, à 90 % ; un, à 60 %.

Annexe E

Variantes du mode opératoire des essais toxicologiques référence à l'aide d'*Hyalella azteca*, décrites dans les documents canadiens et américains

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent. On peut y accéder comme suit :

ASTM (1991) : Norme (lors en vigueur) publiée par l'American Society for Testing and Materials (à Philadelphie [PA]), pour la réalisation des essais de détermination de la toxicité des sédiments à l'aide d'invertébrés dulcicoles. Le document a été l'objet d'une nouvelle publication en 1993 (v. ASTM [1991a] et ASTM [1993], dans la bibliographie).

USEPA (1991a) : Comprend l'ébauche (avril 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage et d'essai d'*H. azteca* utilisés par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA, à Cincinnati (OH). V. USEPA (1991a) dans la bibliographie.

USEPA (1991b) : Présentation sommaire des méthodes d'élevage utiliées par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA à Cincinnati (OH). V. Smith *et al.* (1991b) dans la bibliographie.

DFO (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits) d'élevage et d'essai d'*H. azteca*, utilisés par U. Borgmann, du Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, du ministère des Pêches et des Océans, à Burlington. C'est le mode opératoire publié dans Borgmann et Norwood (1993). V. DFO (1992) dans la bibliographie.

NWRI (1992) : Modes opératoires uniformisés (inédits) d'élevage et d'essai d'*H. azteca*, utilisés par K. Day, de l'Institut national de recherche sur les eaux, de la Direction de la recherche sur les cours d'eau, du Centre canadien des eaux intérieures d'Environnement Canada à Burlington. V. NWRI (1992) dans la bibliographie.

USEPA (1992a) : Norberg-King (1992), de l'Environmental Research Laboratory de l'USEPA à Duluth (MN). Résumé des modes opératoires utilisés dans 18 laboratoires américains et canadiens pour l'élevage et l'essai d'*H. azteca*.

USEPA (1992b) : Smith *et al.* (1992a), de l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA à Cincinnati (OH).

USFWS (1992) : Ingersoll (1992), du Fish and Wildlife Service des États-Unis à Columbia (MO). Énumération des modes opératoires utilisés dans divers laboratoires pour l'élevage et l'essai d'*H. azteca*.

USEPA (1994a) : Méthodes publiées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants des sédiments, à l'aide d'invertébrés dulcicoles, par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger). V. USEPA (1994a) dans la bibliographie.

1. Toxique(s) de référence, type et durée de l'essai, fréquence d'emploi

Document [a]	Toxique(s) de référence	Type d'essai	Durée de l'essai	Fréquence d'emploi
ASTM (1991)	aucun	aucun	—	—
USEPA (1991a)	$CuSO_4$, KCl, NaCl, dodécylsulfate de sodium	eau seulement [b]	96 h	au moins une fois par mois [c]
USEPA (1991b)	n.i.	RI [d], eau seulement	96 h	une fois par semaine
DFO (1992)	n.i. [e]	n.i.	n.i.	n.i.
NWRI (1992)	$CuSO_4$	conditions statiques, eau seulement	48 h	une fois par mois [f]
USEPA (1992a)	variables [g]	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1992b)	KCl	RI, sol enrichi en toxique de référence [h]	7 j	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	NaCl, KCl, Cd, Cu [i]	conditions statiques, eau seulement	96 h	une fois par mois [j]

a. Voir la page précédente pour obtenir la référence exacte.
b. Les amphipodes sont exposés à une gamme de concentrations du toxique de référence dissous dans l'eau douce ; aucun sédiment dans cet essai.
c. Si on le préfère, on peut effectuer cet essai en même temps que les essais de mesure de la toxicité du sédiment.
d. Renouvellement intermittent, avec remplacement journalier de chaque solution expérimentale.
e. Non indiqué.
f. On mesure, deux fois l'an, la toxicité chronique au moyen de $CuSO_4$ et de $CdCl_2$ comme toxiques de référence.
g. Sur les 18 laboratoires sondés, six utilisaient Cd, un Cr, trois Cu, cinq KCl, un NaCl et un Zn. On peut présumer que les quatre laboratoires restants n'utilisaient pas de toxique de référence.
h. On a enrichi un échantillon de sol artificiel, sec, à l'aide d'une série de concentrations du toxique de référence en solution. Chaque concentration, qui représentait l'eau surnageante dans le becher, a été renouvelée journellement au cours de l'essai.
i. On peut utiliser le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le chlorure de cadmium et le sulfate de cuivre. Il pourrait être irréaliste d'éprouver plus d'un ou de deux toxiques de référence de façon systématique (c'est-à-dire mensuellement).
j. Idéalement, on devrait effectuer des essais avec toxiques de référence en même temps que des essais de mesure de la toxicité du sédiment.

2. Âge et taille des animaux, type de récipients, volume de milieu(x), nombre d'amphipodes par enceinte et nombre de répétitions par variante de l'expérience

Document	Âge et taille de l'animal	Enceinte expérimentale	Volume de solution	Volume de sédiment	Nbre d'amphipodes par récipient	Nbre de répétitions
USEPA (1991a)	n.i.[a]	n.i.	n.i.	aucun	n.i.	n.i.
USEPA (1991b)	2 ± 1 j	n.i.	200 mL	aucun	5	4
NWRI (1992)	1 - 10 j	becher de 250 mL	200 mL	aucun	15	3 - 5
USEPA (1992b)	3 - 7 j[d]	becher de 175 mL	100 mL	25 mL	20	4
USEPA (1994a)	7 - 14 j	becher de 250 mL[c]	≥ 100 mL[c]	aucun	≥ 10[c]	≥ 3[c]

a. Non indiqué.
b. En prenant des sujets d'expérience âgés de 7 j, on accroît la puissance de l'essai, parce que la variabilité diminue.
c. On peut également effectuer des essais dans des gobelets de plastique de 30 mL, avec 20 mL et un amphipode par gobelet et au moins 10 répétitions par gobelet.

3. Origine et dureté de l'eau utilisée dans les essais et variables contrôlées

Document	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Variables contrôlées[a]	Fréquence des contrôles
USEPA (1991a)	n.i.[b]	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1991b)	eau de puits diluée[c]	100 mg/L	n.i.	n.i.
NWRI (1992)	eau du robinet déchlorée[d]	n.i.	OD, pH, conduct.	au début et à la fin
USEPA (1992b)	eau de puits diluée[e]	100 mg/L	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	d'élevage, de puits, prélevée sur place, de surface, reconstituée[f]	facultative[f]	pH, alc., dur., conduct.	au début et à la fin
			temp., OD	journellement

a. **alc.** : alcalinité totale ; **conduct.** : conductivité spécifique ; **dur.** : dureté totale ; **OD** : oxygène dissous ; **pH** : concentration des ions hydrogène ; **temp.** : température.
b. Non indiqué.
c. Mélange d'eau de puits et d'eau désionisée.
d. Même origine et dureté que l'eau utilisée pour l'élevage des amphipodes.
e. Mélange d'eau de puits, d'eau déchlorée et d'eau désionisée.
f. Une recette est fournie pour la préparation d'une eau reconstituée convenable, d'une dureté de 90 à 100 mg de $CaCO_3$/L.

4. Température, aération et éclairage au cours de l'essai utilisant un toxique de référence

Document	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Photopériode
USEPA (1991a)	n.i.[a]	n.i.	n.i.
USEPA (1991b)	25 ± 1	n.i.	n.i.
NWRI (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1992b)	25 ± 1	n.i.	16 h
USEPA (1994a)	23	aucune	16 h, 500 à 1 000 lux, tubes fluorescents en spectre large

a. Non indiqué.

5. Substrat utilisé dans l'essai avec toxique de référence

Document	Description du substrat utilisé	Quantité de substrat
USEPA (1991a)	n.i.[a]	n.i.
USEPA (1991b)	n.i.	n.i.
NWRI (1992)	découpure de 2,5 cm sur 2,5 de maillage de nylon Nitex[MC] à ouvertures de 500 µm, préalablement trempé dans l'eau d'élevage pendant 24 h	1 par becher
USEPA (1992b)	sol artificiel sec, enrichi avec une série de concentrations du toxique de référence[b]	25 mL/répétition
USEPA (1994a)	moustiquaire de Nitex[MC] (110 mailles au pouce)	n.i.

a. Non indiqué.
b. Chaque concentration, qui représente l'eau surnageante et l'eau de porosité, est remplacée quotidiennement.

6. Alimentation durant l'essai à l'aide d'un toxique de référence

Document	Aliments	Quantité par récipient	Fréquence des repas
USEPA (1991a)	n.i. [a]	n.i.	n.i.
USEPA (1991b)	*S. capricornutum* et extrait de feuilles de céréales	0,1 mL d'algues, 0,1 mL de céréales	une fois par jour
NWRI (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1992b)	algues et Cerophyll[MC]	1 mL	une fois par jour
USEPA (1994a)	LCT [b]	0,5 mL [c]	aux jours 0 et 2

a. Non indiqué.
b. Levure, Cerophyll[MC] et nourriture pour truite ; 1 800 mg/L, préparation de départ.
c. Pour un becher de 250 mL dans lequel logent 10 amphipodes. Utiliser 0,1 mL de LCT, si le milieu d'essai est un gobelet de 30 mL renfermant un amphipode.

7. Paramètres de mesure et conditions de validité des essais avec toxique de référence

Document	Paramètres de mesure biologiques	Paramètres de mesure statistiques	Conditions de validité
USEPA (1991a)	n.i. [a]	CE50 [b]	n.i.
USEPA (1991b)	survie	CL50 [c]	n.i.
NWRI (1992)	taux moyen de survie	CE50	taux moyen de survie ≥ 90 % [d]
USEPA (1992b)	survie [e]	CI50 [f], CI25 [f], CSEO [g]	n.i.
USEPA (1994a)	survie	CL50	taux moyen de survie ≥ 90 % [d]

a. Non indiqué.
b. Concentration efficace médiane.
c. Concentration létale médiane.
d. Survie des témoins.
e. La masse sèche moyenne s'est révélée un paramètre de mesure insensible dans les essais employant KCl.
f. Concentration inhibitrice ayant le pourcentage précisé d'effet (ici, une inhibition de 50 ou de 25 %).
g. Concentration sans effet observé.

Annexe F

Systématique générale d'*Hyalella azteca* (Saussure, 1858)[44]

Taxonomie et rapports phylogénétiques

Hyalella azteca (Saussure, 1858) fait partie de la famille Hyalellidae, qui appartient à la superfamille Talitroidea de l'ordre des amphipodes (Bulycheva, 1957). La superfamille Talitroidea comprend également les familles Talitridae (puces de mer et orchesties), Dogielinotidae (fouisseurs arénicoles du nord du Pacifique), Najinidae (perceurs d'algues de la même région) et Hyalidae (mangeurs de varech). Quand Bulycheva a révisé la taxonomie des Hyalellidae, cette famille comptait une vingtaine d'espèces décrites, toutes du genre *Hyalella* et toutes endémiques aux eaux douces sud-américaines (la plupart du lac Titicaca), sauf l'espèce nord-américaine *H. azteca*. Bousfield (1979, 1982) a révisé les Hyalellidae, en y intégrant les genres *Parhyalella*, des environnements côtiers antillais, ainsi que *Chiltonia* (Nouvelle-Zélande), *Austrochiltonia* (Australie) et *Afrochiltonia* (Afrique du Sud), des eaux saumâtres et douces des antipodes. Ces trois derniers genres (des chiltoniines) avaient été intégrés à la famille Ceinidae, inquiline et marine, par Barnard (1972) et Barnard et Barnard (1983). Par suite de la révision de Bousfield (1996), *Hyalella* comprend désormais environ 35 espèces décrites (réparties en quatre genres), presque toutes confinées en Amérique du Sud, mais cinq étant présentes dans les eaux douces nord-américaines (y compris *H. azteca*). Le genre se serait détaché du genre *Allorchestes*, qui lui ressemble et qui fréquente les eaux côtières marines du Pacifique, probablement à la fin du Crétacé (à l'époque du Gondwana), lorsque l'Amérique du Sud a commencé à être isolée des autres masses continentales extérieures de l'hémisphère sud (Bousfield, 1984). *H. azteca* est presque certainement un nouveau venu dans les eaux douces d'Amérique du Nord, dans lesquelles ont pénétré ses ancêtres immédiats (à partir de l'Amérique du Sud) après la fermeture de l'isthme de Panama au cours du Pliocène et du Miocène.

La figure F.1 montre l'organisation d'*H. azteca*. L'espèce possède les caractéristiques suivantes des talitroïdes (par opposition aux gammaroïdes) :

(1) antennule 1 sans flagelle accessoire ;

(2) pièces buccales dont la mandibule possède une forte molaire, mais est dépourvue de palpe, tandis que le palpe de la première maxille 1 est vestigial ;

(3) gnathopodes 1 et 2 ordinairement subchiliformes et presque semblables chez les femelles et les immatures, mais très inégaux chez les mâles à maturité (le gnathopode 2 est beaucoup plus gros et puissant) ;

(4) uropode 3 pourvu uniquement d'un seul ramus court ;

---

44. Préparé par E.L. Bousfield, adjoint à la recherche, Royal British Columbia Museum, 675, rue Bellevue, Victoria (C.-B.) V8V 1X4.

(5) lobes du telson courts ou fusionnés (à l'apparence de plaque) ;

(6) branchies coxales situées sur les péréiopodes 2 à 6 uniquement (manquant sur le péréiopode 7) ;

(7) plaques incubatrices (chez la femelle) larges et bordées, sur leur marge, de courts poils à extrémité recourbée.

H. azteca est typique des Hyalellidae, puisqu'il possède les caractéristiques suivantes réunies :

(1) antenne 1 plus longue que le pédoncule de l'antenne 2 ;

(2) palpe du maxillipède possédant un dactyle puissant ;

(3) gnathopode 2 (chez la femelle) régulier (et non en forme de moufle) ;

(4) marge inférieure du péréion 2 (chez la femelle) portant une « encoche copulatoire » ;

(5) segments distaux du péréiopode non élargis ni modifiés pour permettre le fouissage ;

(6) pléopodes normaux (non réduits, non modifiés, non vestigiaux) ;

(7) telson entier, à l'apparence de plaque ;

(8) branchies coxales régulières, non modifiées ;

(9) branchies sternales se présentant de diverses façons sur la marge coxale intérieure des péréiopodes 3 à 7.

Sur le plan du comportement, les hyalellides semblent incapables de sauter dans l'air, tout comme tous les Talitridae et beaucoup d'Hyalidae.

Si on le compare aux autres genres des Hyalellidae, *Hyalella* diffère de *Parhyalella* par ses branchies sternales et la présence d'un palpe sur la première maxille. Il diffère des trois genres australs (des chiltoniines, évoquées ci-dessus) par les caractéristiques plésiomorphes suivantes : les mâles possèdent des pléopodes non modifiés au stade de la maturité sexuelle et un lobe carpien postérieur distinct sur le gnathopode 2.

Répartition et écologie

D'après Bousfield (1958, 1973) et de March (1978), on a observé la présence d'*H. azteca* en Amérique du Nord depuis le centre du Mexique jusqu'à la limite de croissance des arbres au Canada et en Alaska, vers le nord et, à la grandeur du continent, dans presque toutes les eaux douces permanentes où la température en surface, l'été, est régulièrement d'au moins 10 °C.

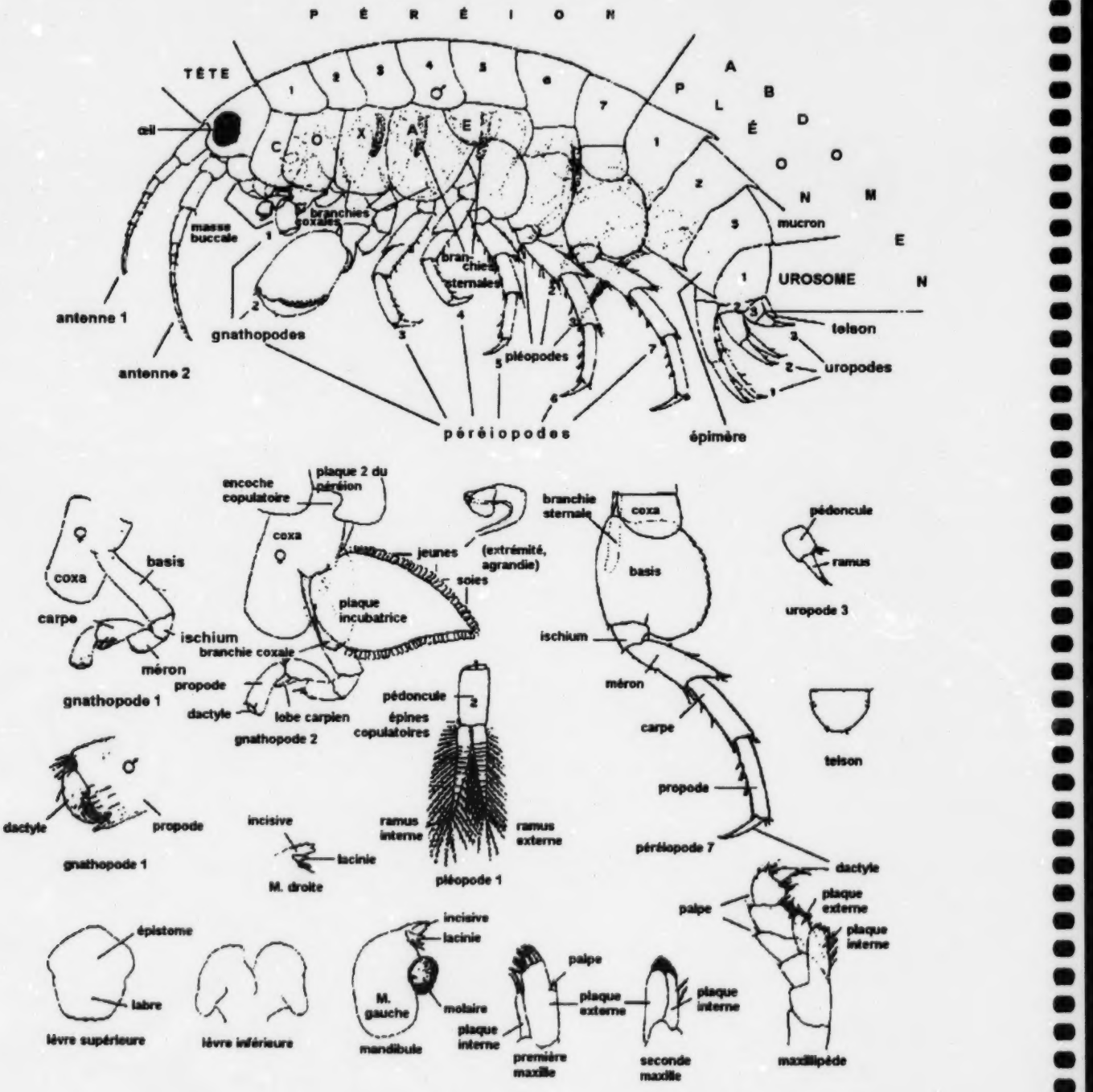


Figure F1. — Schéma du corps, des appendices et des pièces buccales d'*Hyalella azteca* (actualisé d'après Bousfield, 1993)

Hyalella azteca (Saussure, 1858)

Figure F.1. — Diagnose (modifiée d'après Bousfield, 1973)

Longueur du corps : jusqu'à 8 mm chez le mâle ; jusqu'à 6 chez la femelle. Corps petit, dorsalement mucroné sur les segments pléonaux 1 et 2, parfois sur le 3, ou lisse (forme *inermis*). Plaques coxales très développées, la quatrième étant la plus grande ; marge inférieure légèrement et régulièrement épineuse. Tête : œil subové, noir, légèrement plus gros chez le mâle.

Antenne 1 : segments pédonculaires 1 et 2 subégaux, flagelles 8 à 10 segmentés. Antenne 2 : pédoncule plus ténu, segment 5 plus long que le 4 ; flagelles 9 et 10 segmentés. Maxillipède : segment 2 du palpe plus large que long, dépassant la plaque extérieure.

Gnathopode 1 (du mâle) : propodite court, moins développé que le carpe, s'élargissant vers l'extrémité distale ; palme oblique, convexe ; (de la femelle) : propodite étroit, court ; palme verticale, convexe. Gnathopode 2 (du mâle) : propodite très gros, le plus large à l'extrémité distale ; marge postérieure légèrement concave ; palme convexe, avec grosses dents basses près de la charnière ; lobe carpien profond ; (de la femelle) : propodite ténu, allongé, s'élargissant vers l'extrémité distale ; palme courte, convexe, verticale.

Péréiopodes 3 et 4 : marge postérieure des segments 5 et 6 possédant 3 à 5 épines courtes, robustes. Péréiopodes 5 à 7 : base généralement élargie, marge postérieure portant de 4 à 10 sillons peu prononcés ; segments 5 et 6 sans épine ou soie sur la marge postérieure. Plaques latérales abdominales (épimères) 2 et 3 : angles postérieurs nettement subquadratiques, non allongés.

Uropodes 1 et 2 : deux épines marginales ténues sur les deux ramus. Uropode 3 : ramus et pédoncule subégaux en longueur, longue(s) épine(s) sur l'apex. Telson : apex arrondi, avec deux épines ténues, distantes l'une de l'autre.

Branchies coxales des péréiopodes 2 à 6 normales, en forme de sac, la plus petite sur le 6. Branchies sternales en paires à la base des péréiopodes 3 à 5 et 7, de forme régulière, non allongée ni fortement courbée.

H. azteca (Saussure) diffère habituellement des autres espèces nord-américaines du genre *Hyalella* par une dent ou mucron postérodorsal unique sur chacun de ses segments 1 et 2 pléonaux (parfois également sur le 3) et par la forme relativement allongée et étroite du propodite et du carpe du gnathopode 2 chez la femelle, entre autres choses.

Écologiquement, l'espèce préfère les eaux douces quelque peu dures ou alcalines, dont le pH normal se situe dans la fourchette de 6,0 à 8,0. Toutefois, on l'a régulièrement observée aussi dans l'amont (soumis à la marée) des estuaires marins, où la salinité pourrait être d'au moins 2 ou 3 ‰, et dans certains lacs aux eaux alcalines dont la dureté totale pourrait excéder 200 mg/L et où coexistent des artémias (p. ex. dans certains des lacs Quill de la Saskatchewan).

Pour ce qui concerne le substrat et le débit de l'eau, l'espèce abonde habituellement dans les eaux lentiques ou les étangs où la végétation (particulièrement algale) lui fournit gîte et couvert. Elle est plus rare dans les cours d'eau et les autres milieux lotiques, notamment lorsque le fond est constitué de sédiments fins de granulométrie uniforme, qui n'offrent ni protection ni nourriture organique.

Les échanges respiratoires gazeux passent surtout par les paires de branchies coxales des péréiopodes 2 à 6. L'espèce semble mieux tolérer les faibles concentrations d'OD et les fortes concentrations de dioxyde de carbone et de gaz de décomposition que la plupart des autres amphipodes d'eau douce d'Amérique du Nord. Les paires de branchies sternales (à la base des péréiopodes 3 à 5 et 7) joueraient principalement un rôle d'osmorégulation et pourraient faciliter la tolérance à une large gamme d'ions du milieu aquatique et à la fluctuation rapide de leur teneur. Elles serviraient également à la respiration.

Cycle biologique et comportement reproducteur

Le cycle biologique d'*H. azteca* est annuel (Cooper, 1965 ; Strong, 1972 ; Conlan et Hendrycks, communication privée [45]). Au printemps, lorsque la température de l'eau a franchi pour de bon la barre de 10 °C, les femelles ayant hiverné pondent jusqu'à 30 œufs. Après l'éclosion et la libération des jeunes du marsupium ou poche incubatrice, elles continuent de s'accoupler et de pondre. En raison du réchauffement estival de l'eau, les pontes s'accélèrent, mais le nombre d'œufs diminue. Les jeunes venant d'éclore traversent cinq ou six stades de développement avant d'atteindre la maturité. Les femelles s'étant reproduites le printemps meurent avant le début du deuxième hiver, mais les générations de la fin de l'été constituent la prochaine population destinée à hiverner.

Le comportement reproducteur dans les superfamilles d'amphipodes primitifs (nageant librement) est le suivant : les mâles pélagiques se mettent à la recherche de femelles et s'accouplent avec elles librement entre deux eaux. Ce comportement est souvent cyclique. Membre de la superfamille Talitroidea, toutefois, *H. azteca* est classé parmi les amphipodes apparentés aux gammares rampants ou benthiques, plus évolués sur le plan de la reproduction (Bousfield, 1992 ; Bousfield et Staude, 1994). Dans ces groupes, grâce à un processus connu sous le nom de précopulation, préamplexus ou *mate-guarding* (Borowskiy, 1984 ; Conlan, 1990 et 1991), le mâle se fixe au dos de la femelle, habituellement par ses premiers gnathopodes tactiles et préhensiles. Chez *Hyalella*, le dactyle du premier gnathopode du mâle s'insère dans une encoche copulatoire spéciale (à la marge inférieure de la plaque 2 du péréion ; v. fig. F.1) sur les deux côtés du corps de la femelle, ce qui libère les deuxièmes gnathopodes, qui sont gros, pour faire tourner la femelle dans une position qui convient à son transport ou pour repousser les autres mâles. Dans cette position de « monte », le mâle et la

45. Musée canadien de la nature, à Ottawa.

femelle restent accouplés plusieurs heures ou plusieurs jours, jusqu'à la mue de la femelle. L'accouplement (amplexus, transfert de sperme) suit immédiatement, sur le substrat ou dans ce dernier, et il prend peu de temps, souvent quelques secondes, après quoi le couple se sépare pour de bon. Au cours du bref intermède suivant la mue, la femelle est particulièrement vulnérable à la prédation, parfois des mâles d'espèces concurrentes (ou même de l'espèce), comme on l'a montré chez certaines espèces de gammaroïdes.

Annexe G

Préparation de l'aliment LCT[46] destiné à *Hyalella azteca*

Préparation de la levure

1. Ajouter 5,0 g de levure sèche, par exemple de levure Fleischmann's[MC] à 1 L d'eau désionisée.

2. Agiter vigoureusement, sur un agitateur magnétique, brasser vigoureusement à la main ou mélanger mécaniquement, au mélangeur à faible vitesse, jusqu'à ce que la levure soit bien dispersée.

3. Réunir la suspension de levure immédiatement (ne pas la laisser déposer) à des volumes égaux du surnageant des préparations de nourriture pour truite et de Cerophyll[MC] présentées un peu plus loin. Rejeter tout excédent.

Préparation du Cerophyll[MC] (feuilles séchées de céréales en poudre)

1. Porter 5,0 g de Cerophyll[MC] en poudre, séché, de feuilles de céréales, de feuilles de luzerne ou de granulés pour lapin[47] dans un mélangeur.

2. Ajouter 1 L d'eau désionisée.

3. Mélanger à haute vitesse, pendant 5 min au mélangeur ou agiter à vitesse moyenne pendant la nuit, sur un agitateur magnétique.

4. Si on a utilisé un mélangeur, porter ce dernier au réfrigérateur, pour la nuit, afin de laisser déposer le mélange. Si on a utilisé un agitateur magnétique, laisser reposer une heure. Recueillir le surnageant et réunir à des volumes égaux de surnageant de préparations de nourriture pour truite et de levure (v. ci-dessus et ci-dessous). Jeter les excédents.

---

46. Ration mixte constituée de levure, de Cerophyll[MC] (ou d'un produit de remplacement acceptable) et de nourriture pour truite (ou un aliment de remplacement acceptable). Tiré d'USEPA (1989) et d'USEPA (1994a).

47. On peut acheter le Cerophyll[MC] de Ward's Natural Science Establishment Inc., C.P. 92912, Rochester (N.Y.) 14692-9012 (716-359-2502). Parmi les produits de remplacement convenables du Cerophyll[MC], mentionnons les feuilles de céréales séchées, en poudre, les feuilles de luzerne ou les granulés pour lapin (USEPA, 1994a). On peut obtenir les feuilles de céréale de Sigma Chemical Company, C.P. 14508, St. Louis (MO) 63178 (800-325-3010). On peut obtenir des feuilles de luzerne en poudre et séchées des magasins d'aliments de santé et les granulés pour lapin dans les animaleries.

Préparation de nourriture digérée pour truite (Trout Chow) [48]

1. La préparation de nourriture pour truite prend une semaine. Utiliser des granulés de démarrage ou granulés n° 1 [49].

2. Ajouter 5,0 g de granulés de nourriture pour truite à 1 L d'eau désionisée (Milli-Q^MC ou l'équivalent). Bien mélanger au mélangeur et verser dans une ampoule à décanter de 2 L. Laisser digérer avant d'utiliser, par aération continue à partir du fond du récipient, pendant une semaine, à la température ambiante du laboratoire. Remplacer l'eau perdue par évaporation au cours de la digestion. En raison de l'odeur très désagréable habituellement dégagée par la digestion, il faudrait placer le récipient sous hotte ou dans un autre endroit isolé et aéré.

3. À la fin de la digestion, porter au réfrigérateur et laisser reposer au moins 1 h. Passer le surnageant au tamis fin (p. ex. Nitex^MC, 110 mailles au pouce). Réunir à des volumes égaux de surnageant de la préparation de Cerophyll^MC et de la levure (ci-dessus). On peut utiliser le surnageant à l'état frais ou le garder congelé jusqu'à l'emploi. Rejeter ce qui reste de matières particulaires.

Préparation de l'aliment combiné de levure, de Cerophyll^MC et d'aliment pour truite (LCT)

1. Mélanger à fond des volumes égaux (p. ex. 300 mL) des trois aliments déjà décrits.

2. Distribuer des portions aliquotes du mélange dans de petites bouteilles de plastique à bouchon vissant (50 à 100 mL).

3. Idéalement, on devrait conserver l'aliment à 4 °C et l'utiliser dans les deux semaines suivant sa préparation. On peut utiliser immédiatement la préparation fraîche ou on peut la congeler jusqu'à l'utilisation. L'aliment dégelé est conservé au réfrigérateur entre les repas et on doit l'utiliser au plus pendant une semaine. Ne pas garder l'aliment congelé plus de trois mois.

4. Il est conseillé de mesurer, avant emploi, la masse sèche de solides dans chaque lot de LCT. L'aliment devrait en renfermer de 1,7 à 1,9 g au litre.

---

48. L'USEPA (1994a) mentionne qu'un aliment commercial pour poisson en flocons par exemple le Tetra-min^MC peut remplacer la nourriture pour truite.

49. Les fournisseurs de nourriture pour truite (Trout Chow) comprennent Zeigler Bros. Inc., C.P. 95, Gardners, Pa. 17324 (tél. : 717/780-9009) ; Glencoe Mills, 1011 Eliott, Glencoe, Min. 55336 (612/864-3181) ; Murray Elevators, 118 West 4800 South, Murray, Utah 84107) (800/521-9092).

Annexe H

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques[50]

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)[51]

1	2	3	4	5	6	7
10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
3,2	4,6	5,6	6,3	6,8	7,2	7,5
1,00	2,2	3,2	4,0	4,6	5,2	5,6
0,32	1,00	1,8	2,5	3,2	3,7	4,2
0,10	0,46	1,00	1,6	2,2	2,7	3,2
	0,22	0,56	1,00	1,5	1,9	2,4
	0,10	0,32	0,63	1,00	1,4	1,8
		0,18	0,40	0,68	1,00	1,3
		0,10	0,25	0,46	0,72	1,00
			0,16	0,32	0,52	0,75
			0,10	0,22	0,37	0,56
				0,15	0,27	0,42
				0,10	0,19	0,32
					0,14	0,24
					0,10	0,18
						0,13
						0,1

50. Modifié d'après Rochinni *et al.* (1982).

51. Dans une colonne, on devrait choisir une série de cinq (au moins) concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage en poids (p. ex. mg/kg) ou en masse volumique (p. ex. mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par toute puissance de 10. On pourrait utiliser la première colonne si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser les concentrations plus largement espacées, puisqu'elles procureront une faible résolution des limites de confiance entourant toute valeur calculée à effet de seuil.